

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA



DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA
SÍNTESE DE FÁRMACOS METÁLICOS E NÃO-
METÁLICOS

Ângelo Miguel Rodrigues Rocha

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre

Mestrado em Química Farmacêutica e Terapêutica

2013

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA



DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA
SÍNTESE DE FÁRMACOS METÁLICOS E NÃO-
METÁLICOS

Ângelo Miguel Rodrigues Rocha

Dissertação orientada pelo Prof. Doutor Carlos A. M. Afonso e pelo Doutor
Nuno M. T. Lourenço

Mestrado em Química Farmacêutica e Terapêutica

2013

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer aos meus caros orientadores, Prof. Dr. Carlos Afonso e Dr. Nuno Lourenço, por me terem aceite nos seus laboratórios, pela confiança nas minhas capacidades e no meu trabalho, pela dedicação na discussão de ideias e resultados, e, claro, pelo muitíssimo que me ensinaram.

Agradeço a todos os meus colegas de laboratório, em particular à Sara Matias, à Dr.^a Raquel Teixeira, ao Carlos Monteiro, à Catarina Rodrigues, ao Dr. Alexandre Trindade e à Dr.^a Raquel Frade, pela amizade e pela ajuda na elaboração desta tese, bem como de outros projectos.

Deixo também uma palavra de apreço ao Dr. Pedro Vidinha, à Prof.^a Dr.^a Susana Barreiros, à Dr.^a Tânia Carvalho, ao Dr. Alexandre Paiva, ao Dr. Pedro Góis, ao Dr. Hermínio Diogo, ao Prof. Dr. Moura Ramos e ao Dr. André Costa, pessoas que, no último ano, contribuíram não só para desenvolvimento desta tese mas, sobretudo, para a minha formação como cientista.

Aos meus pais e à minha irmã, agradeço tudo o que fizeram por mim, é graças a vocês e aos vossos valores que sou a pessoa que sou, e nunca teria chegado aonde cheguei sem o vosso inesgotável apoio.

Para finalizar, quero agradecer à minha cara-metade, a futura Dr.^a Lia Godinho, por me apoiar, ralar, incentivar e fazer companhia nos dias maus, nos dias bons, nos dias perfeitos, nos dias de sol, nos de dias de chuva e nos dias de mau feitio.

RESUMO

No decorrer desta tese abordaram-se dois temas distintos, sendo ambos relevantes no contexto da indústria farmacêutica. O primeiro tópico de investigação, resolução enzimática cinética de álcoois secundários, resulta da necessidade cada vez maior de compostos quirais opticamente puros. Das várias metodologias existentes, a resolução enzimática cinética é uma estratégia comum na Indústria para a preparação de enantiómeros puros. No sentido de resolver algumas limitações intrínsecas, tem-se procurado a sua conjugação com líquidos iónicos, contudo, nos últimos anos têm surgido inúmeras questões em torno da toxicidade e biodegradabilidade da maioria destes compostos.

Com tal em mente, neste trabalho procurou-se sintetizar novos líquidos iónicos baseados em materiais benignos e estudar a sua aplicação em protocolos de resolução por transesterificação ou hidrólise. Os líquidos iónicos assentam no catião biocompatível colina e em monoésteres de ácidos dicarboxílicos como contra-ião. No caso da resolução por transesterificação, usaram-se monoésteres metílicos ou etílicos de ácido succínico, glutárico ou adípico. Estes compostos foram testados como agentes acilantes iónicos na transesterificação enantiosselectiva, catalisada pela CALB, de (\pm)-1-feniletanol. Infelizmente, não se observou reacção significativa em nenhum dos líquidos iónicos. A presença de grupos carregados e a proximidade destes à função éster aparentam ser as principais causas para a inexistência de reacção. Sintetizou-se ainda um quarto agente acilante iónico do mesmo género mas baseado num monoéster de ácido de cadeia longa (ácido dodecanodióico), para estudo futuro.

No caso da resolução por hidrólise, prepararam-se dois líquidos iónicos com a mesma estrutura geral mas esterificados com um álcool secundário ((\pm)-1-feniletanol). Apesar da elevada solubilidade destes sais de colina em água, a sua aplicação em processos de resolução cinética por hidrólise catalisada pela CALB não teve sucesso. Observou-se uma reorganização dos grupos ionizados das moléculas em solução que dificulta a separação dos produtos e dos materiais de partida.

O segundo tópico de investigação teve como objectivo a preparação de complexos de ródio cationicos. Este género de compostos é importante para o desenvolvimento quer de novos fármacos metálicos quer de metodologias de catálise homogénea em água, que permitam a fácil reutilização dos (dispendiosos) catalisadores.

Após a síntese de várias betaínas com cadeias entre 3 e 11 carbonos, estas foram introduzidas nos complexos metálicos por troca de ligandos a partir de $\text{cis-Rh}_2(\text{OAc})_2(\text{OCOCF}_3)_2$. A purificação dos complexos iónicos por cromatografia de fase normal ou de fase reversa revelou-se infrutífera, pelo que se decidiu estudar a actividade biológica da mistura antes de se investir mais tempo e recursos na sua purificação.

Infelizmente os ensaios com linhas celulares tumorais não foram concluídos a tempo da apresentação desta tese.

Estudou-se também a estabilidade enzimática em soluções aquosas de monoésteres de colina de ácidos dicarboxílicos, em particular do cloreto de hidrogenoglutarilcolina. Os vários tipos de enzimas examinadas (lipases, esterases e proteases) demonstraram ser pouco eficientes na catálise da reacção de hidrólise do monoéster. Em virtude das acrescidas necessidades metabólicas de colina dos tecidos tumorais, estes compostos poderão vir a ser utilizados como ligandos com o objectivo de conferir algum grau de selectividade aos complexos de dirródio(II).

Palavras-chave (I): resolução cinética enzimática, lipase, líquidos iónicos, colina, monoésteres de ácidos dicarboxílicos.

Palavras-chave (II): dirródio(II), betaínas, troca de ligandos, fármacos metálicos, catálise homogénea.

ABSTRACT

Two very different subjects of interest were studied in the course of this thesis, both extremely significant for the pharmaceutical industry. The first topic of research, enzymatic kinetic resolution of secondary alcohols, comes from the ever-growing demand for optically pure chiral compounds. Of the many methods available to Industry for preparation of pure enantiomers, enzymatic kinetic resolution is one of the more common ones. In order to solve some major drawbacks, its use with ionic liquids is an important area of research. However many questions have been raised recently about the toxicity and biodegradability of most of these compounds.

Having this in mind, in this work we synthesized novel ionic liquids based on benign materials and studied their application in resolution methodologies by transesterification or by hydrolysis. These compounds were built from choline, a biocompatible cation, with dicarboxylic acids monoesters as counter-ions. In the transesterification procedure, methyl or ethyl monoesters of succinic, glutaric or adipic acid were used. The synthesized ionic liquids were applied as ionic acylating agents in the CALB catalyzed enantioselective transesterification of (\pm)-1-phenylethanol. Unfortunately, no noteworthy reaction was observed. We believe that the main reasons behind these results are the charged groups and their proximity to the ester function. A fourth ionic acylating agent, with a long chain (dodecanedioic acid) was synthesized, for future study.

As for the hydrolysis procedure, two ionic liquids with the same general structure but esterified instead to a secondary alcohol ((\pm)-1-phenylethanol) were prepared. Despite its high solubility in water, their CALB catalyzed resolution by hydrolysis was not successful. A reorganization of the ionized groups of the molecules in solution did not allow a clean separation between the products and the starting material.

The second topic of research involved the preparation of cationic dirhodium(II) complexes. This kind of compounds is important for the development not only of novel

metallopharmaceuticals but also of novel methods in homogeneous catalysis which allow an easy recycling of these (expensive) catalysts.

The preparation of the novel complexes started with the synthesis of several betaines with chain lengths between 3 and 11 carbon atoms. These betaines were then introduced in the complexes by an ligand exchange protocol from $\text{cis-Rh}_2(\text{OAc})_2(\text{OCOCF}_3)_2$. Since the purification of the ionic complexes by normal or reverse phase chromatography was not successful, the biological activity of the unpurified complexes was accessed prior to further purification endeavors.

Unfortunately, the biological studies with cancer cell lines were not completed before the presentation of this thesis.

The enzymatic stability in aqueous media of dicarboxylic acids choline monoesters, namely hidrogenglutarylcholine chloride, was also studied. All the enzymes studied (lipases, esterases and proteases) revealed to be poor catalysts for the monoester hydrolysis. Due to the increased intake of choline by cancer cells, this type of compounds could be useful a ligand in order to bestow some degree of selectivity to its dirhodium complexes.

Keywords (I): enzymatic kinetic resolution, lipase, ionic liquids, choline, dicarboxylic acids monoesters.

Keywords (II): dirhodium(II), betaines, ligand exchange, metallopharmaceuticals, homogeneous catalysis

ÍNDICE GERAL

Resumo	iv
Abstract	vi
Índice geral	viii
Índice de esquemas	xi
Índice de figuras e tabelas	xv
Lista de abreviaturas	xvi

Capítulo I – Novos líquidos iônicos baseados em colina para resolução enzimática de álcoois secundários

1.1 Introdução	2
1.1.1 Preparação de compostos enantiomericamente puros	3
1.1.1.1 Resolução cinética	6
1.1.2 Lipases e suas aplicações	9
1.1.3 Líquidos iônicos	13
1.1.3.1 Líquidos iônicos baseados em colina	16
1.1.4 Biocatálise em líquidos iônicos	19
1.2 Resultados e discussão	24
1.2.1 Resolução cinética enzimática por transesterificação	25
1.2.1.1 Síntese dos precursores e dos líquidos iônicos	25
1.2.1.2 Ensaio enzimático	27
1.2.1.3 Preparação de um agente acilante iônico de cadeia longa	29
1.2.2 Resolução cinética enzimática por hidrólise	32
1.2.2.1 Síntese dos precursores e dos líquidos iônicos	32
1.2.2.2 Ensaio enzimático	33
1.3 Conclusões	36

Capítulo II – Síntese de novos complexos metálicos para aplicações catalíticas e com potencial actividade biológica	37
2.1 Introdução	38
2.1.1 Aplicações catalíticas	39
2.1.2 Aplicações farmacêuticas	41
2.1.3 Preparação de complexos de dirródio(II)	42
2.2 Resultados e discussão	44
2.2.1 Preparação dos ligandos	44
2.2.2 Preparação dos complexos metálicos	46
2.2.3 Estudos de estabilidade enzimática de ésteres de colina	47
2.3 Conclusões	50
 Capítulo III – Secção experimental	 51
3.1 Métodos gerais	52
3.1.1 Detecção, isolamento e purificação dos produtos reaccionais	52
3.1.2 Caracterização	53
3.1.3 Análise por cromatografia gasosa	53
3.2 Preparação dos líquidos iónicos	54
3.2.1 Procedimento geral para a síntese dos ésteres monoetilicos a partir de anidridos	54
3.2.1.1 Hidrogenossuccinato de etilo (29)	54
3.2.1.2 Hidrogenoglutarato de etilo (30)	55
3.2.2 Síntese de dodecanodioato dietílico (40)	55
3.2.3 Síntese de hidrogenododecanodioato de etilo (39)	56
3.2.4 Síntese de hidrogenoglutarato de (\pm)-1-feniletilo (42)	57
3.2.5 Síntese de hidrogenomaleato de (\pm)-1-feniletilo (45)	58
3.2.6 Procedimento geral para a síntese dos líquidos iónicos	58
3.2.6.1 Succinato de etilo e colina (33)	59
3.2.6.2 Glutarato de etilo e colina (34)	59
3.2.6.3 Adipato de metilo e colina (35)	60
3.2.6.4 Dodecanodioato de etilo de colina (41)	60
3.2.6.5 Glutarato de (\pm)-1-feniletilo e colina (43)	61
3.2.6.6 Maleato de (\pm)-1-feniletilo e colina (46)	61

3.3 Preparação dos complexos de dirródio(II)	62
3.3.1 Procedimento geral para a síntese de ω -bromoalcanoatos de etilo	62
3.3.1.1 3-Bromopropanoato de etilo (60)	62
3.3.1.2 5-Bromopentanoato de etilo (61)	63
3.3.1.3 11-Bromoundecanoato de etilo (63)	63
3.3.2 Síntese de cloreto de [2-(carboxi)etil]trimetilamónio (64)	64
3.3.3 Procedimento geral para a síntese das betaínas 65-67	64
3.3.3.1 Cloreto de [4-(carboxi)butil]trimetilamónio (65)	65
3.3.3.2 Cloreto de [6-(carboxi)hexil]trimetilamónio (66)	65
3.3.3.3 Cloreto de [10-(carboxi)decil]trimetilamónio (67)	66
3.3.4 Síntese de cis-Rh ₂ (OAc) ₂ (OCOCF ₃) ₂ (54)	66
3.3.5 Procedimento geral para a síntese dos complexos iónicos de dirródio(II)	67
3.3.6 Síntese de cloreto de hidrogenoglutarilcolina (68)	67
3.4 Ensaio enzimáticos	68
3.4.1 Procedimento geral para os ensaios de resolução cinética enzimática por transesterificação	68
3.4.2 Procedimento geral para a reação modelo de resolução cinética enzimática por transesterificação de (\pm)-1-feniletanol	68
3.4.3 Procedimento geral para os estudos de estabilidade de glutarato de etilo e colina (34)	69
3.4.4 Procedimento geral para os ensaios de resolução cinética enzimática por hidrólise	69
3.4.5 Procedimento geral para os estudos de estabilidade de cloreto de hidrogenoglutarilcolina (68)	69
Bibliografia	70
Anexos	76
Estudos de estabilidade	77
Espectros de RMN	83

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1.1 – Materiais de partida e principais metodologias disponíveis actualmente para a preparação de compostos enantiomericamente puros. 4

Esquema 1.2 – Resolução do racemato de 1-(3-metoxifenil)etilamina (**1**) por cristalização diastereomérica, em 2-butanona usando como agente de resolução (S)-(+)-ácido mandélico ((S)-**2**). O sal (S,S) é menos solúvel observando-se a sua precipitação após alguns minutos. 6

Esquema 1.3 – Na resolução cinética convencional de misturas racémicas, um agente quirál transforma preferencialmente um dos enantiómeros de partida num produto, enquanto o outro permanece inalterado. Quanto maior for a diferença entre as velocidades de reacção mais eficiente é a resolução. 7

Esquema 1.4 – Resolução cinética enzimática do éster etílico de (\pm)-ácido mandélico ((\pm)-**3**), por hidrólise catalisada pela lipase de fígado de porco, documentada por H. Dakin em 1903. 8

Esquema 1.5 – Resolução cinética do racemato do álcool secundário (**4**) por acetilação catalisada por um complexo planar-quirál de ferro (**6**). 8

Esquema 1.6 – A resolução cinética dinâmica é uma evolução da resolução cinética convencional, à qual se acrescenta um passo de racemização in situ. O decorrer da reacção de resolução origina um desequilíbrio termodinâmico entre os dois isómeros ópticos, que é continuamente ajustado através da racemização do enantiómero que se acumula. Desta forma, é possível obter um dos enantiómeros com um rendimento de 100%. 9

Esquema 1.7 – Hidrólise de triglicéridos em glicerol (**7**) e ácidos gordos, catalisada pelas lipases no interface óleo-água. Em meios não-aquosos a reacção é reversível permitindo o uso das lipases para a síntese de ésteres. 10

Esquema 1.8 – Reacções mais comuns catalisadas por lipases: a) hidrólise de ésteres (em meio aquoso); b) esterificação de ácidos carboxílicos (em meio não-aquoso); c) transesterificação por alcoólise; d) transesterificação por acidólise; e) interesterificação; f) aminólise. 11

Esquema 1.9 – Representação geral da hidrólise de um éster, catalisada pela CALB segundo um mecanismo ping pong bi bi. Este mecanismo envolve a formação de dois intermediários tetra-hédricos e de um acil-enzima. 12

Esquema 1.10 – Temperaturas de transição do líquido iónico propionato de colina (**10**) e de dois possíveis materiais de partida. 14

Esquema 1.11 – Exemplos representativos da evolução dos líquidos iónicos. a) um dos primeiros exemplos, descrito em 1914; b) a primeira geração de líquidos iónicos, sensível à água e ao ar; c) a segunda geração, responsável pela explosão em popularidade destes compostos; d) a terceira geração, focada no desenvolvimento de compostos sustentáveis ambientalmente e com actividade biológica (ou toxicidade) conhecida. 15

Esquema 1.12 – Através de uma resina de troca aniónica, os contra-íons de **8** são substituídos por aniões hidróxido, formando-se hidróxido de colina (**14**) *in situ*. A seguir, este composto é usado na neutralização do ácido desejado, obtendo-se o líquido iónico e água. 18

Esquema 1.13 – Exemplos da aplicação dos líquidos iónicos como solventes não-aquosos. a) Reacção-modelo de transesterificação com resultados comparáveis entre líquidos iónicos e solventes orgânicos convencionais. b) Acetilação da D-glucose (**17**) catalisada pela CALB. Como o substrato é até cem vezes mais solúvel no líquido iónico, a acetilação enzimática apresenta maior regiosselectividade nesse solvente. 20

Esquema 1.14 – Resolução cinética, catalisada pela papaína, da mistura racémica do éster metílico de (para-hidroxifenil)glicina (**20**), por hidrólise em soluções aquosas de [BMIM][BF₄]. A adição do líquido iónico permite uma melhor solubilização do substrato, o que se traduz numa velocidade de reacção superior até 10 vezes à observada em água apenas. 21

Esquema 1.15 – Hidrólise enantioselectiva catalisada pela CALB de um substrato racémico ((±)-ibuprofeno) acoplado a um líquido iónico ((±)-**22**). A separação entre o produto e substrato que não reagiu é efectuada através de uma simples extracção com solvente orgânico. 22

Esquema 1.16 – Metodologia de resolução cinética baseada em agentes acilantes iónicos (**24**), para a resolução catalisada pela CALB de álcoois secundários. Os produtos e os substratos são separados por simples extracção com solvente orgânico. 23

Esquema 1.17 – Estrutura geral dos líquidos iónicos sintetizados neste trabalho. 24

Esquema 1.18 – Métodos utilizados para a síntese dos ésteres monoetílicos de ácidos dicarboxílicos (**29** e **30**) e dos líquidos iónicos baseados em colina (**33-35**). O composto **31** foi adquirido previamente. 26

Esquema 1.19 – Reacção modelo utilizada para comparação das actividades catalíticas da CALB após ou sem contacto prévio com um dos agentes acilantes iónicos. Trata-se de uma resolução cinética, por transesterificação, de (±)-1-feniletanol (**26**) usando acetato de vinilo (**36**) como agente acilante. 29

Esquema 1.20 – Metodologias usadas para a síntese de hidrogenododecanodioato de etilo (**39**). 30

Esquema 1.21 – Líquidos iónicos sintetizados neste trabalho para aplicação em metodologias de resolução cinética enzimática por hidrólise. 33

Esquema 1.22 – Representação da reacção de resolução cinética enzimática por hidrólise do líquido iónico (\pm)-**43**, e das possíveis reorganizações entre as moléculas ionizadas em solução. 35

Esquema 2.1 – Estrutura geral das duas famílias de complexos de dirródio(II) mais comuns, baseadas em ligandos carboxilato e carboxamida respectivamente. L representa os ligandos axiais, geralmente moléculas do solvente. 38

Esquema 2.2 – Ciclo catalítico proposto para as transformações de inserção de compostos diazo a ligações R-H. 39

Esquema 2.3 – Estruturas de dois fármacos metálicos, NAMI-A (**51**) e KP1019 (**52**), que entraram em testes clínicos. 41

Esquema 2.4 – Preparação dos precursores activados a) cis-Rh₂(OAc)₂(OCOCF₃)₂ (**54**) e b) trans-Rh₂(OAc)₂(OCOCF₃)₂ (**56**). 43

Esquema 2.5 – Estrutura geral dos complexos metálicos iónicos sintetizados. 44

Esquema 2.6 – Metodologia usada para a síntese das betaínas **64-67**. Os ω -bromoalcanoatos de etilo **60**, **61** e **63** foram preparados por esterificação dos respectivos ω -bromoácidos (**57-59**). O éster **62** foi adquirido previamente. Após quaternização da trimetilamina, procedeu-se à hidrólise dos ésteres iónicos. 45

Esquema 2.7 – Estrutura geral de monoésteres de colina de ácidos dicarboxílicos. 48

Esquema 2.8 – Metodologia usada para a síntese de cloreto de hidrogenoglutarilcolina (**68**). 48

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Representação gráfica da análise por calorimetria de varrimento diferencial (DSC) do líquido iónico dodecanodioato de etilo e colina (**41**), a temperaturas entre -80 e 80°C. 32

Tabela 1 – Resultados da hidrólise enzimática do composto **68** após 163 ± 6 horas (≈ 7 dias) de incubação a 37°C. 49

LISTA DE ABREVIATURAS

^1H	–	Hidrogénio-1
^{13}C	–	Carbono-13
^{19}F	–	Flúor-19
API	–	Princípio farmacêutico activo
BMIM	–	1-butil-3-metilimidazole
CALA	–	Lipase A de <i>Candida antarctica</i>
CALB	–	Lipase B de <i>Candida antarctica</i>
CD_3OD	–	$[\text{D}_4]$ Metanol
CDCl_3	–	Clorofórmio deuterado
D_2O	–	Água deuterada
DMAP	–	4-Dimetilaminopiridina
DNA	–	Ácido desoxirribonucleico
DSC	–	Calorimetria diferencial de varrimento
δ	–	Desvio químico
ee	–	Excesso enantiomérico
eq	–	Equivalente
FDA	–	Food and Drug Administration (agência regulatória norte-americana)
GC	–	Cromatografia gasosa
HPLC	–	Cromatografia líquida de alta pressão
Hz	–	Hertz
J	–	Constante de acoplamento
m	–	Multipeto
M	–	Molar
mmol	–	Milimoles
MHz	–	Mega-hertz
RMN	–	Ressonância Magnética Nuclear
p.f.	–	Ponto de fusão
ppm	–	Partes por milhão

q	–	Quarteto
R_f	–	Factor de retenção
CCF-FR	–	Cromatografia de camada fina de fase reversa
s	–	Singleto
t	–	Tripleto
t_g	–	Temperatura de transição vítrea
CCF	–	Cromatografia de camada fina
t_r	–	Tempo de retenção
UV	–	Ultra-violeta

CAPÍTULO I

NOVOS LÍQUIDOS IÔNICOS BASEADOS EM COLINA PARA RESOLUÇÃO ENZIMÁTICA DE ÁLCOOIS SECUNDÁRIOS

1.1

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a procura por compostos quirais enantiomericamente puros tem crescido exponencialmente, estimulada sobretudo pela indústria farmacêutica. Não só porque estes compostos são importantes intermediários na produção de princípios farmacêuticos activos (APIs), mas principalmente devido ao reconhecimento da importância da quiralidade na actividade biológica das moléculas.

Na Natureza a maioria dos compostos orgânicos são quirais e, geralmente, apenas um dos isómeros ópticos é sintetizado e incorporado nos sistemas biológicos. É, por isso, esperado que a interacção de cada enantiómero de compostos quirais com estes sistemas seja diferente, o que se deverá traduzir em efeitos biológicos diversos. De facto, existem casos em que cada enantiómero induz actividades biológicas distintas (ex. limoneno) ou exemplos em que apenas um deles apresenta actividade (ex. vitamina C). Mais críticos são os casos em que um dos isómeros ópticos é prejudicial para a fisiologia humana. A Talidomida é um desses exemplos; sedativo administrado a grávidas no final da década de cinquenta, foi formulado a partir de uma mistura racémica, porém, anos após o início da sua comercialização, descobriu-se que apenas um dos enantiómeros é responsável pelo efeito terapêutico. Tragicamente o outro enantiómero é um poderoso agente teratogénico. Hoje em dia, no sentido de evitar novos acidentes, as agências farmacêuticas regulatórias recomendam a comercialização de fármacos enantiomericamente puros, como demonstra o facto de em 2003, dos fármacos com substâncias quirais aprovados pela FDA, 80% continham um único enantiómero. A somar a estas questões, a necessidade de processos cada vez mais eficientes e mais conscientes em termos ambientais levam a que a comunidade científica e a Indústria continuem a impulsionar o desenvolvimento de novas metodologias para a obtenção de compostos opticamente puros.¹⁻⁴

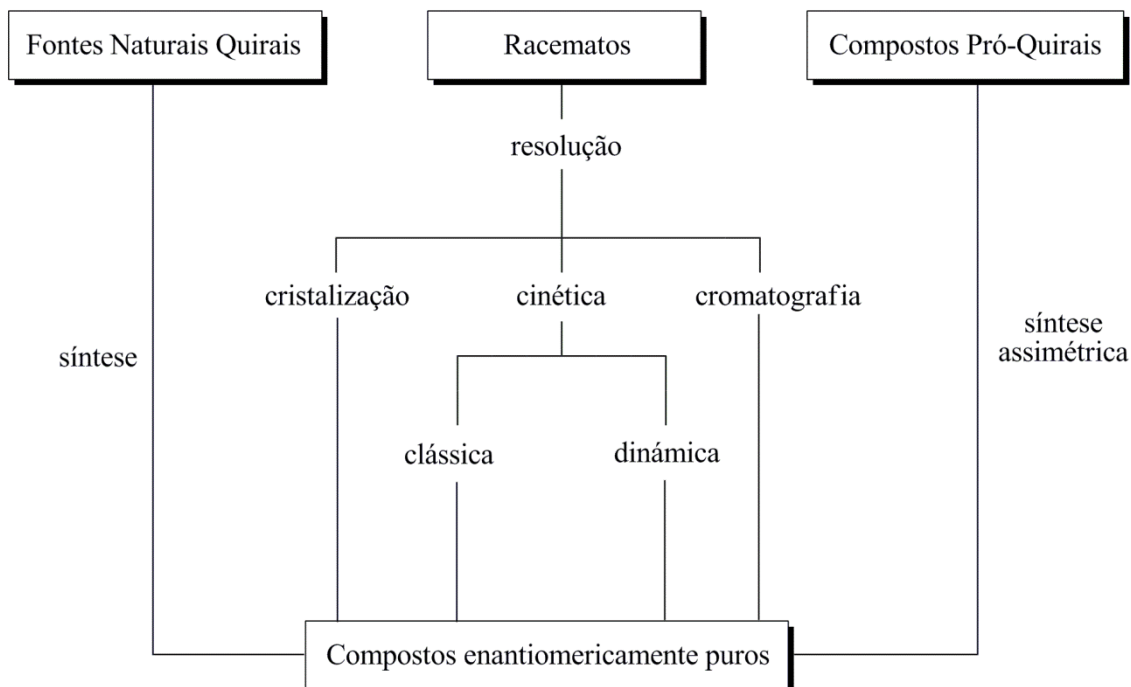
1.1.1 Preparação de compostos enantiomericamente puros

As várias metodologias existentes actualmente podem ser englobadas em três processos gerais (Esquema 1.1): síntese a partir de fontes naturais quirais, síntese a partir de compostos pró-quirais e resolução de misturas racémicas.^{2, 5, 6}

O primeiro grupo faz uso de compostos que ocorrem na Natureza como um isómero óptico puro, e que são posteriormente aproveitados como materiais de partida em várias transformações químicas. Hidratos de carbono, terpenos e alcaloides são alguns dos compostos que podem ser extraídos e modificados eficientemente. Na esmagadora maioria dos casos, somente um dos enantiómeros é biossintetizado e susceptível de extracção, como por exemplo a (-)-morfina. No entanto, também existem alguns exemplos em que é possível obter ambos os isómeros ópticos puros, quando estes são produzidos em espécies ou géneros diferentes, como acontece com a (+)-carvona (presente na *Carum carvi* L.) e a (-)-carvona (presente na *Mentha spicata*). Dentro desta categoria também se incluem processos fermentativos microbianos, onde se obtêm compostos enantiomericamente puros a partir de substratos de baixo custo. L-amino ácidos, ácido láctico, ácido cítrico, penicilinas e outros antibióticos, hormonas e vitaminas são facilmente preparados através deste processo. Contudo, a oferta natural é limitada ou, por vezes, insuficiente para suprimir as necessidades da Indústria, pelo que se torna inevitável recorrer exclusivamente à química sintética para a obtenção de determinadas estruturas quirais.^{2, 6, 7}

A segunda categoria de metodologias envolve modificações químicas em materiais de partida pró-quirais, produzindo-se exclusivamente um dos enantiómeros ou um excesso enantiomérico (ee) muito elevado, com um rendimento teórico de 100%. Reacções típicas desta categoria, vulgarmente designada por química assimétrica, são a redução de cetonas a álcoois secundários,^{4, 6} transaminações,^{6, 8} aminações redutivas,^{8, 9} epoxidações,^{2, 10} reacções de Mannich,^{9, 11} entre outras. Nestas reacções, o uso de catalisadores quirais, normalmente complexos de metais de transição, é ubíquo pois é a geometria da sua estrutura que permite a indução de quiralidade no produto final e define qual o isómero óptico que se vai formar. Questões em termos ambientais, de sustentabilidade e de complexidade e custo dos catalisadores são algumas das actuais limitações da química assimétrica. Possíveis soluções passam pelo uso de catalisadores de ferro (devido à abundância deste elemento), pela organocatálise (tendo em conta a

disponibilidade e reduzida toxicidade das substâncias usadas), ou por biocatalisadores (devido à crescente biblioteca de enzimas disponíveis, às condições reacionais mais amenas e ao menor impacto ambiental).^{2, 4-6, 11-13}



Esquema 1.1 – Materiais de partida e principais metodologias disponíveis actualmente para a preparação de compostos enantiomericamente puros.^{2,5}

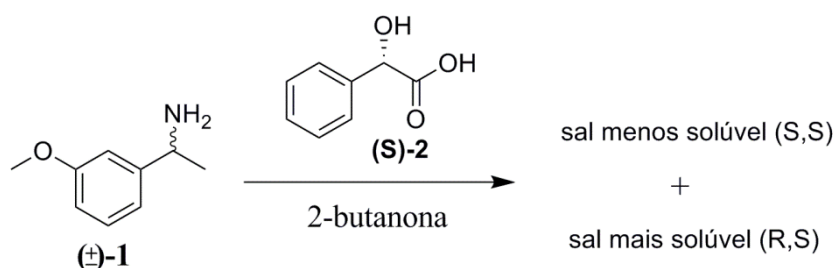
O último grupo de métodos baseia-se na separação dos isómeros ópticos de misturas racémicas, isto é, misturas equimolares de dois enantiómeros. A separação é exequível devido às diferentes interações físicas e/ou químicas que cada enantiómero estabelece com o ambiente, geralmente quiral, a que são submetidos neste género de procedimentos. Tendo em conta que se parte de uma mistura binária, (quase) todos os métodos deste grupo têm como desvantagem intrínseca um rendimento teórico máximo de 50% para cada enantiómero. A resolução de misturas racémicas é, no entanto, vantajosa em relação à química assimétrica já que a obtenção dos racematos é mais simples e consideravelmente menos dispendiosa, e são protocolos particularmente convenientes quando ambos os enantiómeros são desejados. Tendo em conta as técnicas utilizadas para a separação, este grupo pode ser dividido em três grandes famílias: resolução por cristalização, separação por técnicas cromatográficas e resolução cinética.^{2, 5, 14}

A separação por cristalização é, sem dúvida, o procedimento mais antigo de resolução. Em 1848, Louis Pasteur foi o primeiro a obter amostras opticamente puras de ácido tartárico, após cristalização de sais deste ácido a partir de um racemato. Dependendo das propriedades de cristalização da mistura racémica, este tipo de resolução pode ser efectuado por cristalização preferencial directa ou por cristalização diastereomérica. A cristalização preferencial directa aplica-se quando uma mistura racémica forma conglomerados, isto é, quando se formam cristais enantiomericamente puros de cada enantiómero. Em virtude desta propriedade, se a uma solução sobressaturada da mistura racémica forem adicionadas pequenas quantidades de um dos enantiómeros, apenas os cristais desse enantiómero vão crescer em torno destas “sementes”. Após filtração, obtém-se uma solução enriquecida do outro enantiómero podendo-se induzir a sua cristalização através da adição de “sementes” desse enantiómero. Este processo implica um controlo escrupuloso das condições experimentais e a sua optimização pode ser morosa. Infelizmente a aplicação desta técnica é limitada pois menos de 20% dos racematos cristalizam sob a forma de conglomerados.^{3, 14-16}

Para as “verdadeiras” misturas racémicas, ou seja, racematos cujos cristais também são misturas de enantiómeros, é necessário recorrer à cristalização diastereomérica. Neste processo, os enantiómeros são convertidos em diastereoisómeros através da sua reacção com um agente de resolução ou uma mistura conhecida de agentes de resolução. Os agentes de resolução são enantiómeros opticamente puros, que se podem ligar ao composto quirál de partida por reacção ácido-base, por ligações covalentes ou através da formação de complexos. Os diastereoisómeros formados, ao contrário dos enantiómeros de partida, apresentam propriedades físico-químicas diferentes entre si, nomeadamente a solubilidade em determinado(s) solvente(s), pelo que podem ser separados, frequentemente por cristalização (Esquema 1.2). Após a separação e remoção do agente de resolução, obtêm-se os enantiómeros puros (com um rendimento teórico máximo de 50%). A principal desvantagem é o facto do processo de escolha do agente de resolução e dos solventes mais adequados poder ser complexo, demorado e trabalhoso.^{3, 6, 14-16}

As técnicas cromatográficas têm por base o uso de sistemas de separação com fases estacionárias quirais, comumente constituídas por derivados de polissacáridos como a celulose ou as ciclodextrinas. Devido à natureza quirál da fase estacionária a sua

interacção com cada enantiómero no eluente é diferente, o que se traduz em afinidades e, conseqüentemente, tempos de retenção distintos. As principais vantagens destas técnicas são a elevada selectividade, a simplicidade e rapidez do método (quando não são necessários passos de derivatização) e a possibilidade de executar a separação em modo contínuo. Além disso, o controlo dos resultados de métodos de síntese em escala laboratorial é executado, normalmente, através de técnicas cromatográficas analíticas (HPLC e/ou GC), pelo que os dados conhecidos acerca da selectividade, solubilidades, tempos de retenção, entre outros, permitem agilizar e acelerar o processo de aumento de escala. No entanto, este aumento de escala raramente se procede de forma tão pacífica pois 1) necessita de fases estacionárias disponíveis em grande quantidade, de baixo custo e duradouras; 2) a optimização das condições de trabalho do sistema de separação e do sistema de eluentes, no sentido de encontrar a melhor relação selectividade/eficiência no menor tempo de operação possível, pode ser complexa e trabalhosa.^{1, 17}

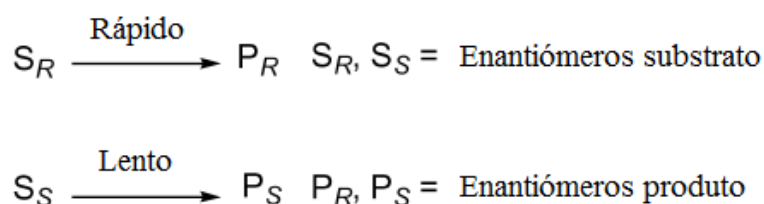


Esquema 1.2 – Resolução do racemato de 1-(3-metoxifenil)etilamina (**1**) por cristalização diastereomérica, em 2-butanona usando como agente de resolução (S)-(+)-ácido mandélico (**(S)-2**). O sal (S,S) é menos solúvel observando-se a sua precipitação após alguns minutos.¹⁸

1.1.1.1 Resolução cinética

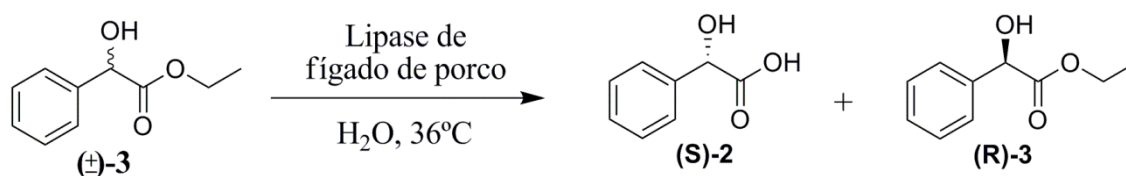
Resolução cinética é definida como um processo onde os dois enantiómeros de uma mistura racémica são transformados em produtos por um agente quiral a velocidades de reacção desiguais (Esquema 1.3). O agente quiral pode ser um biocatalisador, por exemplo uma lipase, ou um catalisador químico, por exemplo um complexo metálico. A interacção do agente quiral com a mistura binária de partida origina dois estados de transição com configurações distintas e energias associadas diferentes. A configuração mais estável determina o enantiómero com a velocidade de

reacção mais elevada, enquanto a discrepância de energias determina a diferença entre as duas velocidades de reacção e a respectiva distribuição dos produtos. Para uma resolução eficiente deve existir uma diferença considerável entre as velocidades de reacção, ou seja, um dos enantiómeros deve ser transformado no produto enquanto o outro mantém-se praticamente inalterado. Este procedimento tem uma desvantagem intrínseca, no final da reacção obtêm-se, no máximo, 50% do produto do enantiómero desejado e 50% do enantiómero que não reagiu. Apesar desta limitação, a resolução cinética convencional continua a ser um dos principais métodos utilizados pela Indústria para a obtenção de compostos opticamente puros, em virtude da sua simplicidade, baixo custo e aplicabilidade a virtualmente todos os grupos funcionais. Ademais, é o método mais conveniente quando ambos os enantiómeros são desejados.^{14, 19, 20}

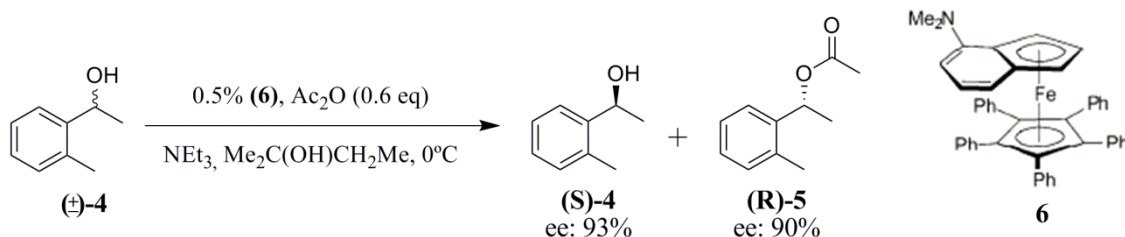


Esquema 1.3 – Na resolução cinética convencional de misturas racémicas, um agente quiral transforma preferencialmente um dos enantiómeros de partida num produto, enquanto o outro permanece inalterado. Quanto maior for a diferença entre as velocidades de reacção mais eficiente é a resolução.

A primeira resolução cinética data de 1858, quando Louis Pasteur observou que o fungo *Penicillium glaucum* digeriu exclusivamente o isómero natural (R,R) do ácido tartárico. O primeiro estudo de resolução com lipases data de 1903, quando H. Dakin observou a hidrólise enantiosselectiva de ésteres de ácido mandélico catalisada pela lipase de fígado de porco (Esquema 1.4). Desde então que os processos de resolução cinética enzimáticos se tornaram habituais na Indústria. Apesar do primeiro exemplo de resolução cinética não-enzimática ser de 1899, só na última década é que estes procedimentos se tornaram mais eficientes e começaram a despertar um maior interesse quer da comunidade científica quer da Indústria. Contudo, apesar de surgirem cada vez mais exemplos de métodos de resolução não-enzimáticos (Esquema 1.5), este género de protocolos continua a ser incomum em comparação com os processos enzimáticos. Tal deve-se ao elevado número e variedade de biocatalisadores disponíveis a custos acessíveis, à elevada enantiosselectividade e às condições de operação mais simples, amenas e sustentáveis.^{5, 6, 14, 20-22}



Esquema 1.4 – Resolução cinética enzimática do éster etílico de (±)-ácido mandélico ((±)-3), por hidrólise catalisada pela lipase de fígado de porco, documentada por H. Dakin em 1903.²³



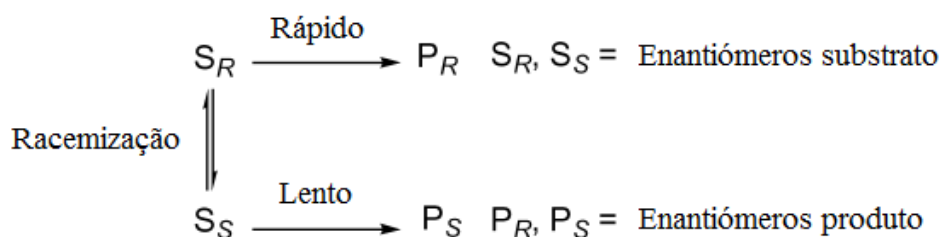
Esquema 1.5 – Resolução cinética do racemato do álcool secundário (4), por acetilação catalisada por um complexo planar-quiral de ferro (6).²⁴

Dentro dos processos enzimáticos, deve destacar-se a utilização das lipases. Esta subfamília de enzimas é, sem dúvida, crítica para os procedimentos de resolução cinética de dois grupos funcionais preponderantes na química orgânica, os álcoois (secundários) e os ácidos carboxílicos.^{14, 19}

Tal como foi referido anteriormente, a resolução cinética de racematos é particularmente conveniente quando ambos os enantiómeros são necessários. Contudo, frequentemente somente um dos isómeros ópticos é desejado, o que significa que este procedimento implica, ainda antes de se começar, a perda de 50% do material de partida. Em termos económicos tal facto pode não compensar o uso de (bio)catalisadores e substratos de baixo custo, principalmente no caso da Indústria Farmacêutica. No sentido de superar esta questão, desenvolveram-se vários processos mais eficientes, dos quais a resolução cinética dinâmica é, provavelmente, o mais importante. Neste procedimento, combina-se a resolução cinética clássica com um segundo passo, *in situ*, de racemização (Esquema 1.6). Com o decorrer da reacção de resolução, um dos enantiómeros é transformado rapidamente enquanto o outro mantém-se inalterado. No sentido de repor o equilíbrio termodinâmico, o isómero óptico que se acumula é racemizado continuamente. Se a velocidade da reacção de racemização for superior à velocidade de reacção do enantiómero menos reactivo com o agente quiral, é possível converter todo o material de partida num dos enantiómeros, ou seja, com um

rendimento de 100%. Obviamente que as condições experimentais devem ser tais que a racemização do produto é evitada.^{5, 20, 25-27}

A racemização pode ser efectuada termicamente, quimicamente (ex. complexos metálicos), biocataliticamente (ex. racemases) ou de forma espontânea. Os complexos metálicos são os agentes de racemização mais comuns. No entanto apresentam uma série de limitações: 1) necessitam de temperaturas de reacção elevadas que podem originar reacções secundárias indesejadas ou ser incompatíveis com as enzimas utilizadas como agente quiral de resolução; 2) são constituídos por metais de transição nobres, o que significa que são catalisadores de elevado custo e apresentam questões em termos de sustentabilidade. Alternativamente pode recorrer-se à racemização enzimática, isto é, às racemases (EC 5.1.X.X), que envolvem, intrinsecamente, condições operacionais mais amenas. Porém, neste momento, esta família de enzimas ainda é limitada, não existindo, por exemplo, racemases capazes de inverter grupos álcool.^{5, 20, 26-28}

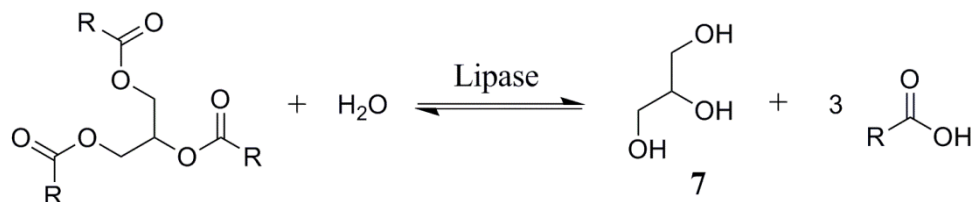


Esquema 1.6 – A resolução cinética dinâmica é uma evolução da resolução cinética convencional, à qual se acrescenta um passo de racemização *in situ*. O decorrer da reacção de resolução origina um desequilíbrio termodinâmico entre os dois isómeros ópticos, que é continuamente ajustado através da racemização do enantiómero que se acumula. Desta forma, é possível obter um dos enantiómeros com um rendimento de 100%.

1.1.2 Lipases e suas aplicações

As lipases (EC 3.1.1.3) são, hoje em dia, ferramentas extremamente relevantes para a química orgânica. Estas enzimas, tal como as esterases, pertencem à família das hidrolases de serina. Distinguem-se das esterases (EC 3.1.1.1) sobretudo pelos seus substratos preferenciais; as esterases aceitam compostos hidrossolúveis enquanto as lipases apresentam maior actividade para triglicéridos, os seus substratos naturais. Nos sistemas biológicos os triglicéridos são digeridos enzimaticamente em glicerol (7) e

ácidos gordos, no interface óleo-água (Esquema 1.7). As lipases podem, portanto, ser utilizadas para a síntese eficiente e sob condições amenas de ácidos carboxílicos, a partir da hidrólise de ésteres em meio aquoso (Esquema 1.8 a)). Como a reacção de hidrólise é reversível em meios não-aquosos, as lipases podem também ser utilizadas para a síntese de ésteres, por esterificação, transesterificação ou interesterificação (Esquema 1.8 b-e)). Apesar de tudo, a principal aplicação das lipases reside na resolução cinética enzimática de álcoois, ácidos carboxílicos e seus derivados, através das mesmas reacções já enunciadas. As lipases são biocatalisadores de excelência para procedimentos de resolução cinética pois: 1) são extremamente acessíveis, quer em termos de quantidade quer de custo; 2) são particularmente estáveis em solventes orgânicos; 3) podem ser utilizadas na forma livre ou imobilizadas em diversas matrizes, facilitando a sua recuperação e reutilização; 4) não necessitam de co-factores; 5) apresentam boas a excelentes enantiosselectividades, sob condições de reacção amenas. De salientar que são cada vez mais utilizadas noutros métodos de síntese, já que várias destas enzimas aceitam substratos não-naturais e catalisam reacções alternativas (Esquema 1.8. f)), fenómeno denominado de promiscuidade catalítica.^{5, 14, 25, 27}

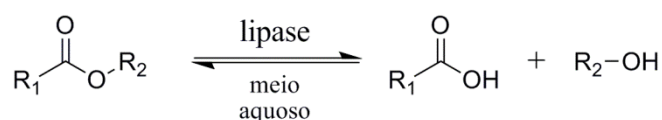


Esquema 1.7 – Hidrólise de triglicéridos em glicerol (7) e ácidos gordos, catalisada pelas lipases no interface óleo-água. Em meios não-aquosos a reacção é reversível permitindo o uso das lipases para a síntese de ésteres.

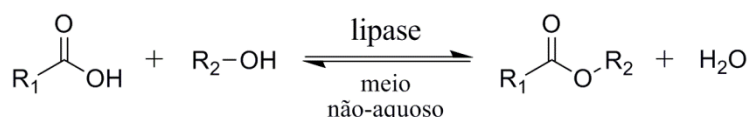
Dentro da subfamília das lipases, a lipase B de *Candida antarctica* (CALB) é a mais utilizada quer pela comunidade científica quer pela Indústria. Trata-se de uma enzima muito robusta, disponível a baixo custo, selectiva a vários níveis e que aceita diversos substratos naturais e não-naturais. A CALB retém a sua actividade no intervalo de pH entre 3.5 e 9.5, e a sua desnaturação ocorre a temperaturas entre 50 e 60°C, consoante o pH. Em termos de selectividade, a CALB é uma enzima particularmente valiosa, tendo em conta a sua quimiosselectividade, regiosselectividade e enantiosselectividade. Quimiosselectividade define-se como a capacidade de uma enzima de reagir preferencial com um determinado grupo funcional em detrimento de

outro(s) grupo(s) diferentes presentes na molécula. A CALB, por exemplo, reage mais rapidamente com álcoois do que com grupos tiol. Regiosselectividade é definida como a capacidade de uma enzima de identificar um grupo funcional entre vários do mesmo tipo consoante a posição destes no substrato. A CALB executa transacilações em açúcares praticamente apenas no álcool primário, de entre os vários grupos álcool existentes. Por último, mas não menos importante, enantiosselectividade define-se como a capacidade de uma enzima em reconhecer preferencialmente um dos enantiómeros de um composto quiral. A CALB apresenta soberba enantiosselectividade em função do óptimo acondicionamento de álcoois secundários na restritiva bolsa de interacção para álcoois do sítio activo.²⁹⁻³¹

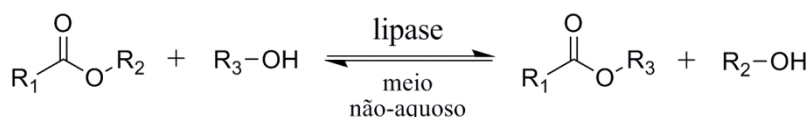
a) Hidrólise



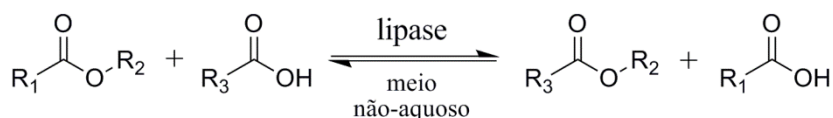
b) Esterificação



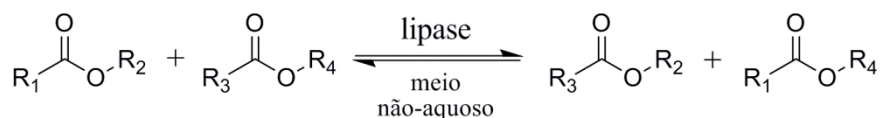
c) Transesterificação por alcoólise



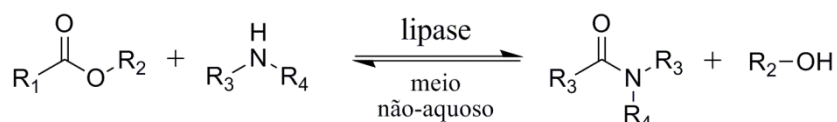
d) Transesterificação por acidólise



e) Interesterificação

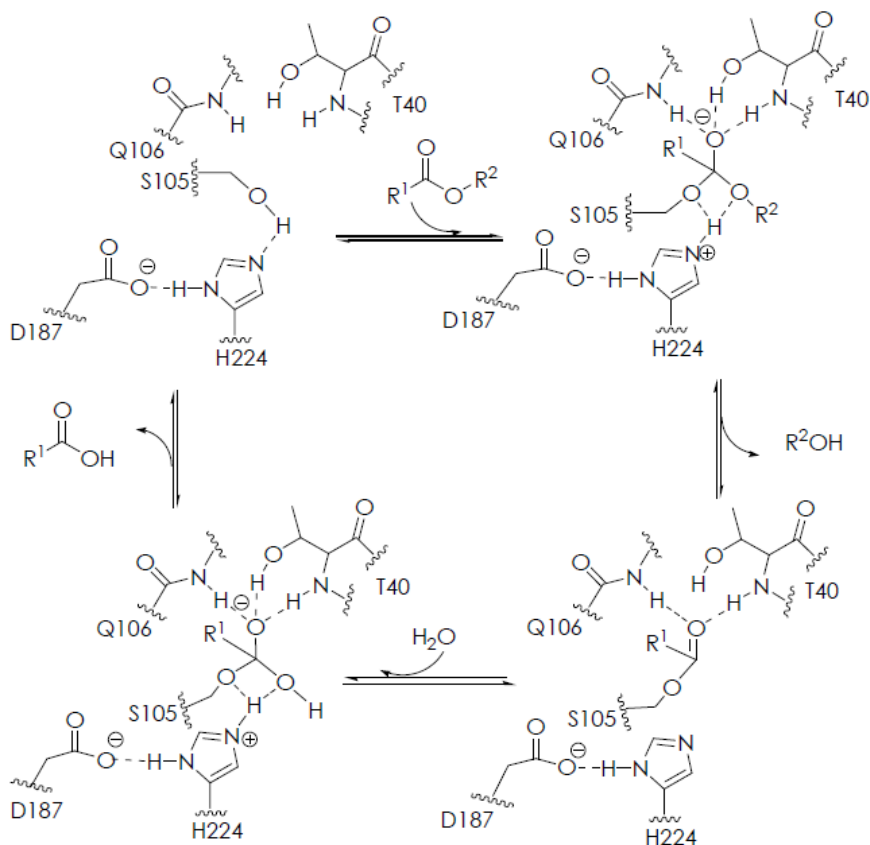


f) Aminólise



Esquema 1.8 – Reacções mais comuns catalisadas por lipases: a) hidrólise de ésteres (em meio aquoso); b) esterificação de ácidos carboxílicos (em meio não-aquoso); c) transesterificação por alcoólise; d) transesterificação por acidólise; e) interesterificação; f) aminólise.

A imobilização da CALB é ubíqua pois além de facilitar a sua recuperação, também se traduz num aumento da estabilidade e durabilidade sob condições extremas e em solventes orgânicos. Dentro da gama comercial de enzimas imobilizadas, a CALB (sob a denominação Novozym® 435) é, por larga margem, a mais comum. A enzima é produzida através de fermentação por uma espécie *Aspergillus* geneticamente modificada e imobilizada numa resina macroporosa de carácter hidrofóbico (denominada Lewatit VP OC 1600).^{29, 32}



Esquema 1.9 – Representação geral da hidrólise de um éster, catalisada pela CALB segundo um mecanismo ping pong bi bi. Este mecanismo envolve a formação de dois intermediários tetrahédricos e de um acil-enzima.^{27, 29}

Como membro da família das hidrolases de serina, a CALB apresenta no centro activo uma serina (S105) activada por uma histidina (H224) e um ácido aspártico (D187). Em conjunto, estes três aminoácidos constituem a denominada tríade catalítica. A CALB actua segundo um mecanismo ping pong bi bi (Esquema 1.9). Primeiro o grupo éster do substrato entra no sítio activo e é activado através da coordenação aos aminoácidos T40 e Q106 na bolsa do oxanião. De seguida ocorre o ataque da serina

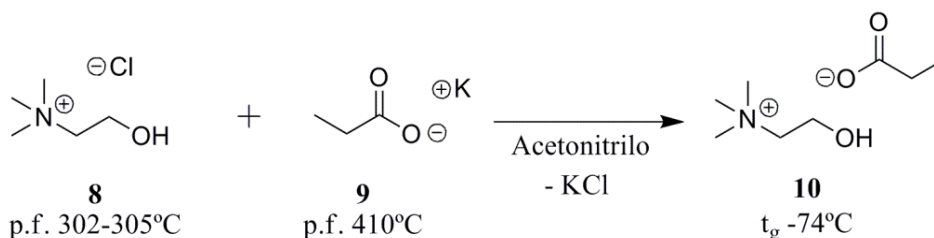
activada ao grupo carbonilo do substrato, formando-se um intermediário tetra-hédrico estabilizado pela bolsa do oxanião. Após a libertação do álcool forma-se o acil-enzima. De forma a regenerar o biocatalisador, uma molécula de água liga-se ao acil-enzima, formando-se um novo intermediário tetra-hédrico. Com a reformação do carbonilo ocorre a separação entre a lipase e o ácido carboxílico. Alternativamente pode ocorrer transesterificação (ou aminólise) se a reacção ocorrer em meio não-aquoso e estiver presente um nucleófilo como um álcool (ou amina).^{27, 29}

1.1.3 Líquidos iónicos

Líquidos iónicos são substâncias constituídas inteiramente por iões e que fundem a temperaturas inferiores ao ponto de ebulição da água, sendo que um número considerável encontra-se no estado líquido à temperatura ambiente. Os seus baixos pontos de fusão, comparativamente com sais comuns, devem-se à assimetria em termos de estrutura e tamanho dos catiões e/ou dos aniões, o que dificulta o seu empacotamento e inibe a formação da rede cristalina. O composto propionato de colina (**10**) é um exemplo típico (Esquema 1.10); os materiais de partida cloreto de colina (**8**) e propionato de potássio (**9**) apresentam pontos de fusão acima de 300°C, enquanto o líquido iónico encontra-se no estado líquido a partir de -74°C.³³⁻³⁵

Os líquidos iónicos partilham uma série de propriedades físico-químicas preponderantes para a sua popularidade, como pressão de vapor negligenciável, reduzida inflamabilidade, elevada estabilidade (térmica e electroquímica) e consideráveis intervalos de temperatura no estado líquido. A maioria apresenta também elevada conductividade (iónica e/ou térmica) e amplas janelas de potencial electroquímico. De um modo geral, são compostos com elevadas viscosidades, semelhantes ao glicerol e ao mel. Apesar da natureza iónica, em termos de polaridade apresentam valores moderados, similares ao etanol. O interesse por estas substâncias advém não só das suas propriedades físico-químicas únicas mas também do facto de estas poderem ser modeladas consoante as necessidades do utilizador, em virtude da panóplia de combinações possíveis entre diferentes catiões e/ou aniões. Por norma, este género de compostos são miscíveis com solventes polares como água e metanol, e imiscíveis com solventes apolares como éter dietílico e acetato de etilo. Porém, graças à

mutabilidade dos cátions e/ou aniões é possível sintetizar líquidos iônicos hidrofóbicos miscíveis com a maioria dos solventes orgânicos. Esta versatilidade permite ainda construir líquidos iônicos capazes de dissolver substâncias de difícil solubilização como biopolímeros, açúcares, triglicéridos e outros produtos naturais.^{33, 34, 36}

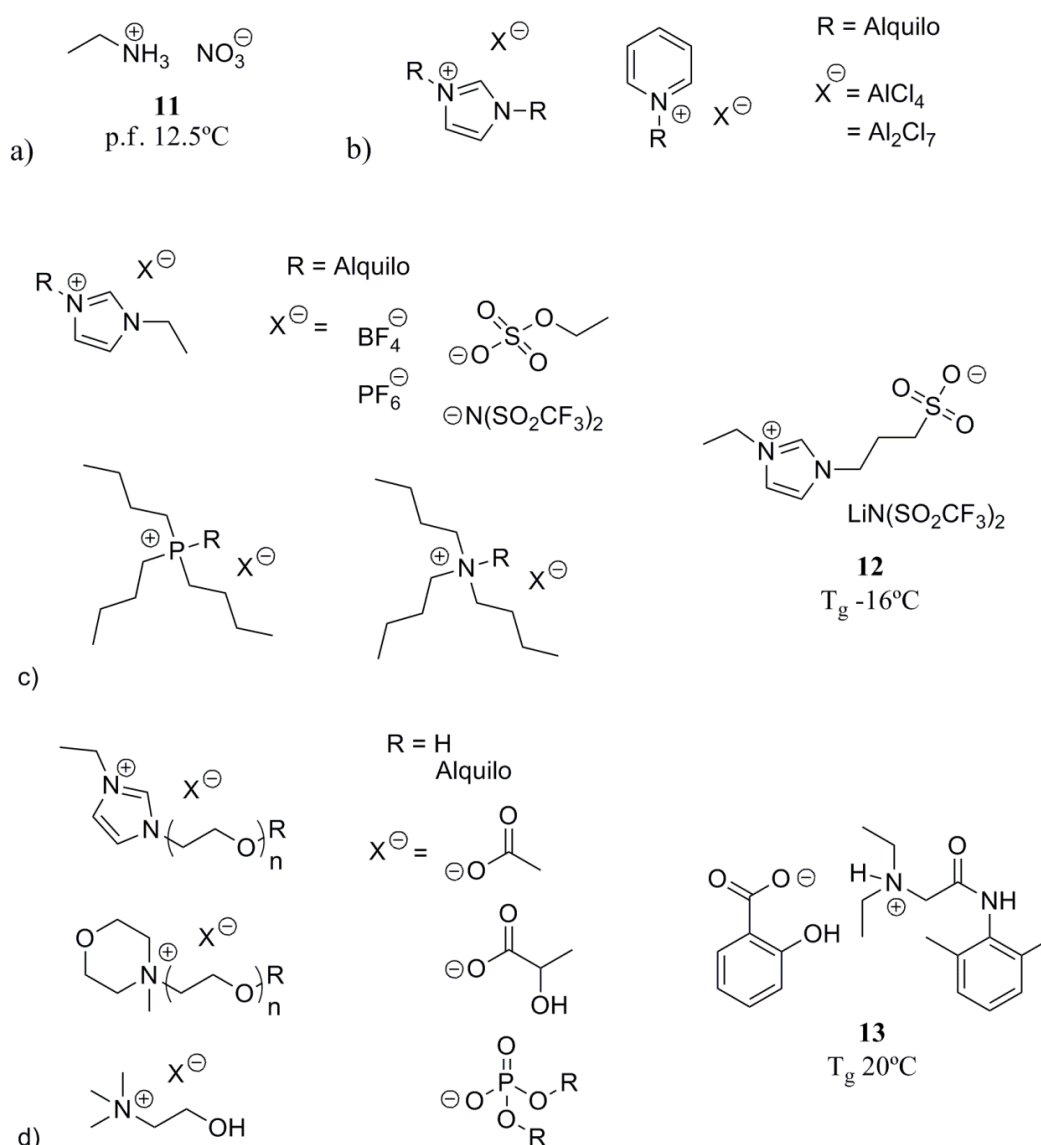


Esquema 1.10 – Temperaturas de transição do líquido iônico propionato de colina (**10**) e de dois possíveis materiais de partida.³⁵

Os primeiros líquidos iônicos descritos na literatura datam de 1914 (Esquema 1.11 a)), contudo só no último terço desse século é que este género de compostos captou real interesse da comunidade científica. Entre 1960 e 1990 surgiram uma série de estudos físico-químicos sobre líquidos iônicos baseados em sais de dialquilimidazólio ou de alquilpiridínio, com halogenetos de alumínio como contra-íões (Esquema 1.11 b)). Apesar das propriedades electroquímicas interessantes, estes aniões limitaram a aplicabilidade destes compostos fruto da sua instabilidade ao ar e em água. No sentido de ultrapassar estas restrições, surgiu na década de noventa a denominada segunda geração de líquidos iônicos (Esquema 1.11 c)). Estes compostos fazem uso, principalmente, dos mesmos tipos de cátions da geração anterior, no entanto incorporam aniões com maior estabilidade e, sobretudo, com uma imensa diversidade estrutural e funcional. Por esta altura, ficou patente a referida capacidade de modificação das propriedades físico-químicas através de combinações entre diferentes cátions e/ou aniões, o que permitiu a expansão destes compostos a múltiplas áreas científicas além da electroquímica (ex. óptica não-linear e biocatálise). A sua versatilidade em conjunto com a denominação, talvez prematura, de solventes “verdes” (devido à pressão de vapor negligenciável e à reduzida inflamabilidade) catapultou os líquidos iônicos para a ribalta.^{33, 34, 36, 37}

Todavia nos últimos anos, em virtude do amadurecimento dos conhecimentos sobre estas substâncias, chegou-se à conclusão de que, por si só, os líquidos iônicos podem não ser tão “amigos do ambiente” como se julgava. Múltiplos estudos têm provado que a maioria dos cátions dialquilimidazólio, por larga margem o tipo de catião

mais usado, apresenta problemas de biodegradabilidade, o que se traduz numa maior bioacumulação e toxicidade. Os próprios procedimentos de síntese não estão isentos de preocupações, ambientais e de saúde, já que geralmente envolvem o uso de fortes agentes alquilantes, como por exemplo sulfatos dialquílicos, sultonas ou halogenetos de alquilo. Estes compostos podem alquilar o DNA, sendo por isso conhecidos agentes carcinogénicos. Ademais, os elevados custos associados a esta geração de líquidos iónicos, desde os materiais de partida até aos métodos de purificação, têm mitigado também a sua disseminação além da comunidade académica.^{34, 36, 38-40}



Esquema 1.11 – Exemplos representativos da evolução dos líquidos iónicos. a) um dos primeiros exemplos, descrito em 1914; b) a primeira geração de líquidos iónicos, sensível à água e ao ar; c) a segunda geração, responsável pela explosão em popularidade destes compostos; d) a terceira geração, focada no desenvolvimento de compostos sustentáveis ambientalmente e com actividade biológica/toxicidade conhecida.^{33-37, 39-44}

Actualmente, encontra-se em pleno desenvolvimento a terceira geração de líquidos iónicos (Esquema 1.11 d)). Esta nova geração é constituída por materiais de baixo custo, provenientes de fontes renováveis, e intrinsecamente biocompatíveis como amino ácidos, ácidos carboxílicos naturais (ex. ácido láctico) e catiões benignos (ex. colina). Quando tal não é praticável, os componentes destes líquidos iónicos são concebidos de forma a facilitar a sua (bio)degradação no fim do seu ciclo-de-vida. Uma maior biodegradabilidade pode ser favorecida através, por exemplo, da introdução de grupos éster ou pela substituição de cadeias alifáticas por cadeias com grupos éter ou álcool.^{34-36, 40-42}

Nesta última geração, também se inclui o desenvolvimento de líquidos iónicos baseados em APIs. Apesar do número considerável de princípios activos comercializados na forma de sais, só nos últimos anos é que a sua combinação com contra-íões com propriedades úteis e/ou complementares ganhou notoriedade. A versatilidade que advém da panóplia de combinações possíveis permite modelar as propriedades dos líquidos iónicos de APIs e ultrapassar limitações frequentes de fármacos, como reduzida solubilidade ou polimorfismos na fase sólida. É possível, inclusive, desenvolver líquidos iónicos bifuncionais como o composto **13** (Esquema 1.11 d)), que resulta da combinação de ácido salicílico (um anti-pirético e anti-inflamatório) com lidocaína (um anestésico local).⁴⁴⁻⁴⁶

1.1.3.1 Líquidos iónicos baseados em colina

Os líquidos iónicos baseados no catião benigno colina são cada vez mais relevantes, fruto das questões económicas e ambientais que surgiram nos últimos anos em relação à maioria dos líquidos iónicos e seus procedimentos de síntese.

A colina é um sal de amónio quaternário, de fórmula geral $[(CH_3)_3NCH_2CH_2OH]^+X^-$. Pode ser extraída de fontes naturais como a gema de ovo ou a soja, sob a forma de fosfoésteres ou na forma livre por hidrólise destes. Hoje em dia, é produzida sinteticamente na ordem dos milhões de toneladas, sob a forma de cloreto de colina (**8**), como aditivo para rações de galinhas. Trata-se de um composto fundamental para todos os organismos, em particular para os animais e as plantas onde é crítica para a biossíntese dos fosfolípidos predominantes das membranas celulares. Nos seres

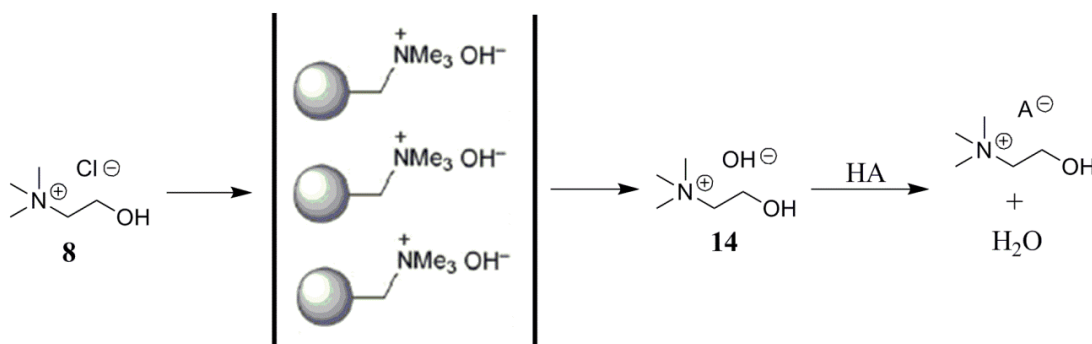
humanos é ainda 1) o precursor do neurotransmissor acetilcolina; 2) necessária para a produção e transporte de lípidos no fígado; 3) o principal precursor da S-adenosilmetionina, composto utilizado nos processos de metilação do organismo, incluindo o do DNA. Por estes motivos a colina é considerada, desde 1998, um nutriente essencial na dieta humana.⁴⁷⁻⁵⁰

A colina é, portanto, um excelente ponto de partida para a preparação de líquidos iónicos a baixo custo e com toxicidade reduzida. Os métodos de síntese de líquidos iónicos baseados em colina ou derivados podem ser organizados em quatro grupos: alquilação de aminas terciárias, reacções de metátese, reacções de neutralização e modificações no grupo álcool, geralmente esterificações. O primeiro grupo envolve a alquilação de aminas terciárias como a 2-dimetilaminoetanol ou a trimetilamina, ambas de baixo custo e de reduzida toxicidade. A alquilação, no entanto, recorre geralmente a halogenetos de alquilo (reacção de Menshutkin), como iodometano ou 2-cloroetanol, que são fortes agentes alquilantes e, como tal, levantam questões em termos de saúde. Neste sentido têm-se desenvolvido métodos de alquilação alternativos, com agentes de alquilação mais seguros como sulfonatos alquílicos (ex. 4-tolueno sulfonato de metilo), carbonatos dialquílicos (ex. dimetilcarbonato) e inclusive carboxilatos de alquilo (ex. salicilato de metilo). Este tipo de métodos é o único dos quatro que parte exclusivamente de materiais de partida não-iónicos para produzir compostos iónicos, o que se traduz, normalmente, em passos de purificação mais simples.⁵¹⁻⁵⁶

Na reacção de metátese, misturam-se quantidades equimolares de um halogeneto de colina, geralmente o cloreto, e de um sal de lítio, sódio ou potássio do anião pretendido, num solvente adequado (Esquema 1.10). Os dois sais combinam-se, originando o líquido iónico de colina e o respectivo halogeneto de lítio, sódio ou potássio. Para líquidos iónicos hidrofílicos, devem-se usar solventes orgânicos como acetonitrilo ou etanol, onde o sal inorgânico formado é praticamente insolúvel, o que induz a sua precipitação e desloca o equilíbrio no sentido dos produtos. No caso de líquidos iónicos hidrofóbicos, deve-se usar água, pois induz a formação de um sistema bifásico. Na fase aquosa permanece qualquer material de partida que não reaja e o sal inorgânico formado, enquanto a fase hidrofóbica é constituída pelo líquido iónico puro. Apesar de ser simples, este protocolo tem como principal desvantagem as contaminações (intrínsecas) sob a forma de halogenetos. Estas contaminações têm de

ser tidas em conta, pois sabe-se que podem alterar as propriedades físico-químicas dos líquidos iônicos e podem induzir a desnaturação de proteínas.^{51, 57-59}

A produção de líquidos iônicos por neutralização é de todos o processo mais simples. Neste método misturam-se quantidade equimolares de hidróxido ou hidrogenocarbonato de colina (comercializadas sob a forma de soluções aquosas ou metanólicas) com a forma ácida do anião desejado. O único subproduto é água (e dióxido de carbono, no caso do hidrogenocarbonato de colina), que é simplesmente removida por evaporação a pressão reduzida. Além disso, são procedimentos livres de halogenetos. Os principais inconvenientes deste procedimento são o elevado preço e instabilidade (principalmente no caso do hidróxido) destas bases de colina. Com o passar do tempo, ocorre degradação do catião por reacção de eliminação, libertando-se trimetilamina e acetaldeído.^{41, 58}



Esquema 1.12 – Através de uma resina de troca aniônica, os contra-íons de **8** são substituídos por aniões hidróxido, formando-se hidróxido de colina (**14**) *in situ*. A seguir, este composto é usado na neutralização do ácido desejado, obtendo-se o líquido iônico e água.³⁵

Um dos procedimentos mais comuns para a síntese de líquidos iônicos de colina é, na realidade, uma mescla entre estes dois últimos grupos de processos (Esquema 1.12). Neste género de procedimentos parte-se de cloreto de colina (**8**) e recorre-se a uma resina de troca aniônica com íons hidróxido (ou hidrogenocarbonato) para substituir os íons cloreto pelos presentes na resina. Deste modo obtém-se hidróxido (ou hidrogenocarbonato) de colina *in situ* e consoante as necessidades do utilizador, podendo ser usada para a neutralização de ácidos tal e qual como foi descrito anteriormente. Este procedimento é muito usual pois combina as vantagens dos dois grupos. Por um lado, parte-se de cloreto de colina (**8**), que é um material de partida muito mais acessível do que hidróxido de colina (**14**), e o problema de degradação não se coloca pois a base de colina é preparada no momento. Por outro lado, mantém-se a

simplicidade do processo de neutralização, onde o único subproduto é água (e dióxido de carbono, no caso do hidrogenocarbonato). Além disso, as impurezas na forma de halogenetos são mínimas, pois estes ficam aprisionados na resina.^{35, 48, 55}

Por último, temos as modificações no grupo álcool, geralmente por esterificação da colina ou de aminas precursoras, seguido da sua alquilação. Estas reacções são efectuadas no sentido de introduzir funcionalidades extra no líquido iónico final ou para modelar ou exacerbar determinada propriedade e/ou função.^{52, 55}

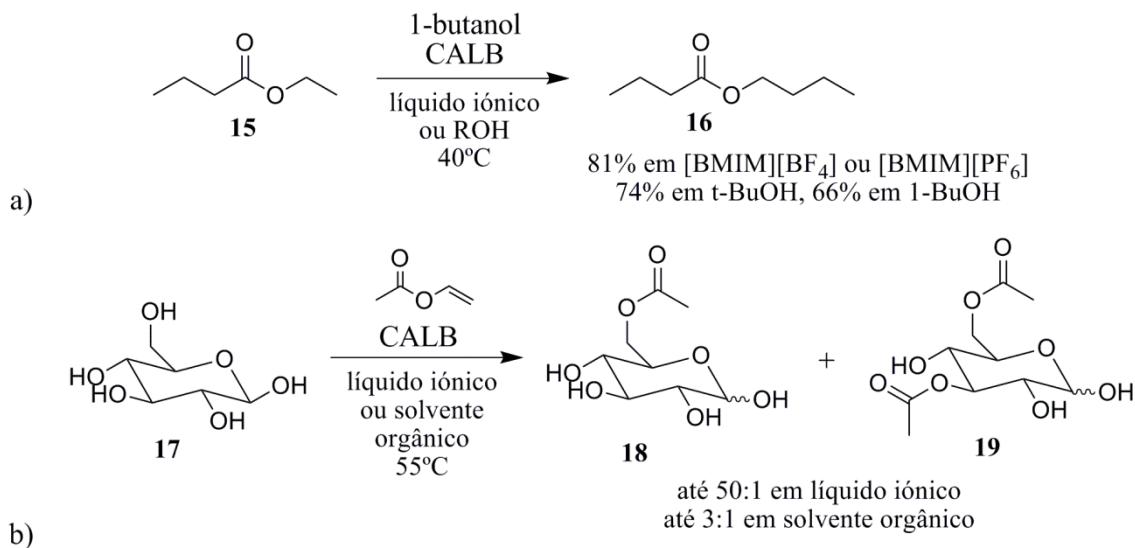
1.1.4 Biocatálise em líquidos iónicos

Embora a água seja o solvente natural e recomendado para a biocatálise, em virtude da sua abundância e impacto ambiental nulo, a verdade é que se trata de um solvente pouco apetecível para a Indústria. Não só a maioria dos compostos orgânicos é pouco hidrossolúvel como, quando solubilizados em meios aquosos, podem degradar-se ou sofrer reacções paralelas indesejadas. Ademais, a remoção deste solvente é energeticamente dispendiosa devido aos seus elevados ponto de ebulição e calor de vaporização. O desenvolvimento de métodos biocatalíticos em solventes orgânicos não só resolve estas limitações, como apresenta vantagens, nomeadamente melhor solubilização dos compostos orgânicos, fácil recuperação da enzima, velocidades de conversão superiores e melhores rendimentos. Além disso, expande o espectro de reacções sintéticas susceptíveis de serem catalisadas enzimaticamente, tendo em conta o facto de estas reacções serem termodinamicamente desfavorecidas em meios aquosos em prol de processos hidrolíticos.^{5, 14, 19}

Apesar de tudo, o uso de solventes orgânicos também acarreta problemas. Por um lado as actividades enzimáticas são, normalmente, inferiores em comparação com as observadas no meio natural. Por outro, grande parte dos solventes orgânicos é extremamente volátil, inflamável e tóxica, quer para o ambiente quer para os seres humanos. Os líquidos iónicos, pelo contrário, são caracterizados pelas suas pressões de vapor negligenciáveis e por serem não-inflamáveis. Além disso, são capazes de dissolver substratos difíceis e as suas propriedades físico-químicas podem ser facilmente modeladas de modo a satisfazer as especificidades de cada processo em particular. Estas características conciliadas com o facto de determinadas combinações

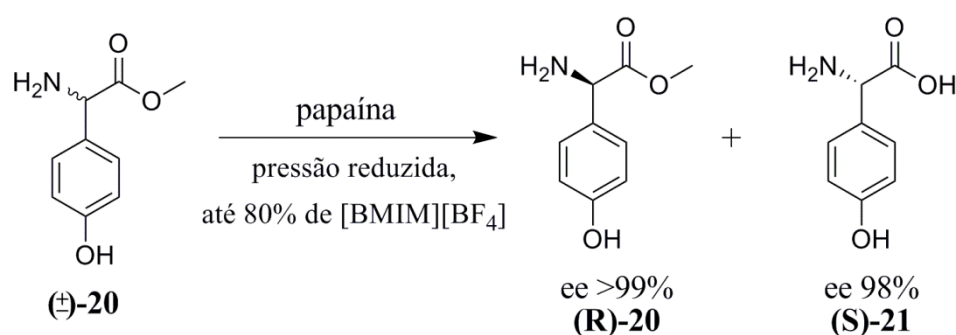
de aniões e catiões (Séries de Hofmeister) promoverem a estabilização das enzimas e, inclusive, fomentarem a actividade catalítica e melhorarem a regio e/ou enantioselectividade enzimática, elevam os líquidos iónicos a solventes extremamente promissores para a biocatálise.^{34, 36, 59-61}

A primeira biotransformação em líquidos iónicos foi descrita por Erbeldinger *et al* no ano 2000.⁶² Esse trabalho relata a síntese de Z-aspartamo, usando como biocatalisador a protease termolisina e como solvente o líquido iónico [BMIM][PF₆] (com um teor de água de 5%). O ano de 2000 foi profícuo nesta área, pois nesse mesmo ano foi também descrita a primeira biotransformação em líquidos iónicos usando células completas, por Lye *et al*,⁶³ bem como o primeiro processo enzimático com lipases em líquidos iónicos, por Sheldon *et al*.⁶⁴ Neste trabalho os autores estudaram a actividade catalítica da CALB (na forma livre) em vários tipos de reacções e observaram que os resultados em líquidos iónicos anidros eram comparáveis aos observados em solventes orgânicos (Esquema 1.13 a)). Desde então, múltiplos estudos que conjugam lipases com líquidos iónicos demonstraram que estas enzimas, apresentam boas actividades, estabilidades e selectividades neste género de solventes.^{59, 65}



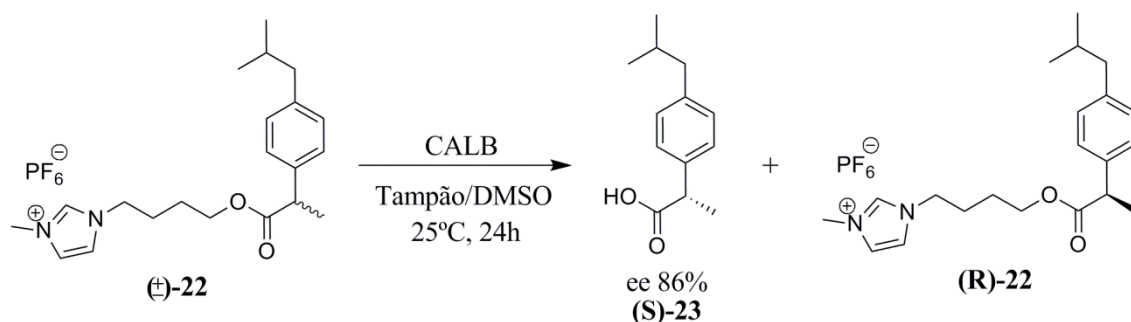
Esquema 1.13 – Exemplos da aplicação dos líquidos iónicos como solventes não-aquosos. a) Reacção-modelo de transesterificação com resultados comparáveis entre líquidos iónicos e solventes orgânicos convencionais.⁶⁴ b) Acetilação da D-glucose (**17**) catalisada pela CALB. Como o substrato é até cem vezes mais solúvel no líquido iónico, a acetilação enzimática apresenta maior regioselectividade nesse solvente.⁶⁶

A aplicação de líquidos iónicos em biocatálise pode ser dividida em quatro tipos de processos: 1) como co-solventes em soluções aquosas; 2) como solventes em sistemas de extracção bifásicos; 3) como solventes não-aquosos; 4) como pontos de ancoragem de substratos. Os líquidos iónicos podem ser adicionados a soluções aquosas para promover a solubilização de reagentes de difícil dissolução em água ou como forma de controlo da actividade da água (Esquema 1.14). A principal vantagem, em comparação com solventes orgânicos como sulfóxido de dimetilo ou etanol, advém das enzimas tolerarem melhor os líquidos iónicos. O segundo tipo de aplicação envolve o uso de líquidos iónicos, sobretudo hidrofóbicos, como solventes em métodos de extracção bifásicos. Líquidos iónicos hidrofóbicos, por exemplo, podem ser utilizados como segunda fase em processos biocatalíticos aquosos com células completas, já que estes compostos interferem menos com as membranas celulares do que os solventes orgânicos hidrofóbicos convencionais. Líquidos iónicos em geral podem também ser usados em métodos de extracção com fluídos supercríticos, onde são insolúveis devido à sua natureza iónica. O terceiro grupo, provavelmente o tipo de procedimento mais comum, faz uso dos líquidos iónicos como meios de reacção não-aquosos (Esquema 1.13), o que permite a aplicação de lipases em reacções de síntese em prol das reacções hidrolíticas. As principais vantagens em relação aos solventes orgânicos convencionais prendem-se com questões de segurança ambiental e de saúde mencionadas anteriormente, e pelo facto das enzimas serem, geralmente, mais estáveis nos líquidos iónicos.^{34, 36, 67, 68}



Esquema 1.14 – Resolução cinética, catalisada pela papaína, da mistura racémica do éster metílico de (para-hidroxifenil)glicina (**20**), por hidrólise em soluções aquosas de [BMIM][BF₄]. A adição do líquido iónico permite uma melhor solubilização do substrato, o que se traduz numa velocidade de reacção superior até 10 vezes à observada em água apenas.⁶⁹

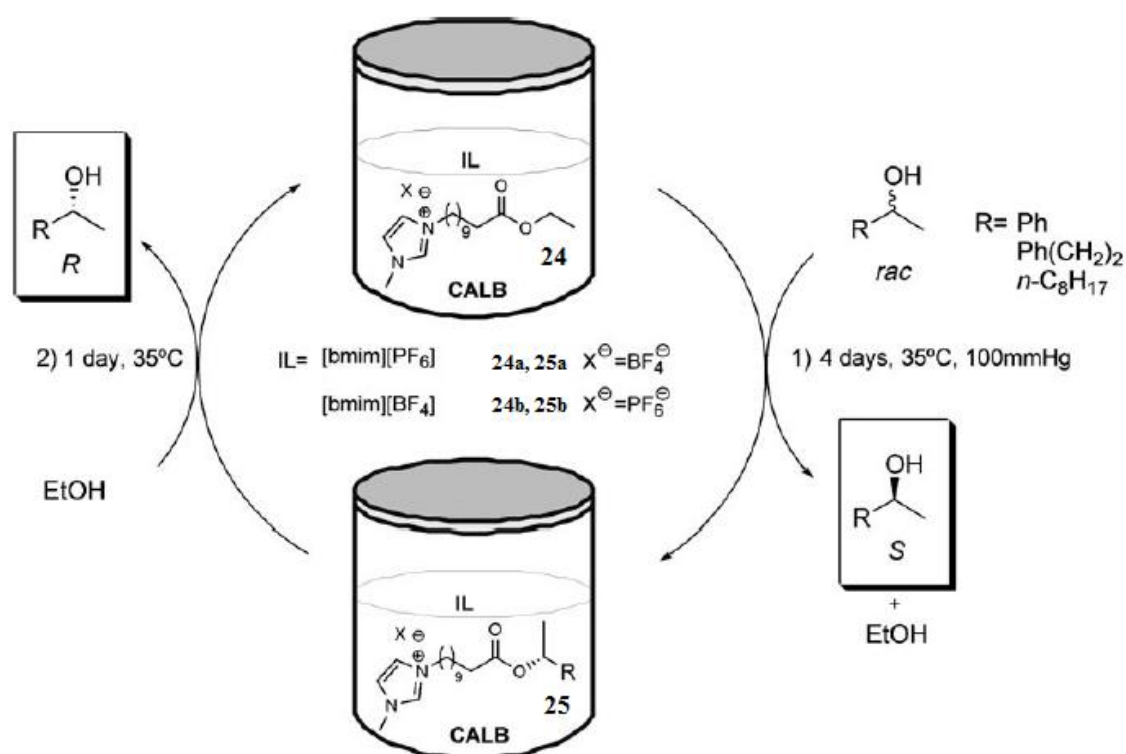
O quarto tipo de procedimentos deriva da necessidade de superar uma das maiores condicionantes na disseminação dos protocolos de resolução cinética enzimática, sobretudo de álcoois, quer em líquidos iónicos quer em solventes orgânicos convencionais. A separação do produto e do substrato que não reagiu é complicada e, geralmente, tem de se recorrer à purificação por técnicas cromatográficas. No laboratório tal necessidade não constitui um problema, no entanto à escala industrial apresenta sérias limitações. Vários grupos, incluindo o nosso, têm abordado este problema através do acoplamento do substrato racémico a um líquido iónico antes ou durante a reacção enzimática. Em 2007, Naik *et al* descreveram um dos primeiros exemplos deste género de protocolos. Nesse trabalho os autores acoplaram, através de uma ligação éster, (\pm)-ibuprofeno a um líquido iónico de imidazólio em que uma das suas cadeias apresentava um grupo álcool terminal (Esquema 1.15). De seguida, procederam à resolução cinética por hidrólise catalisada pela CALB. Como o enantiómero que não é reconhecido pela enzima permanece ligado ao líquido iónico, a sua separação do produto é facilmente exequível por extracção deste com éter dietílico (que é imiscível com o líquido iónico). Após a remoção do álcool livre, o outro enantiómero pôde ser recuperado após hidrólise química do substrato e o líquido iónico reciclado para novo acoplamento.^{34, 70}



Esquema 1.15 – Hidrólise enantiosselectiva catalisada pela CALB de um substrato racémico ((\pm)-ibuprofeno) acoplado a um líquido iónico ((\pm)-22). A separação entre o produto e substrato que não reagiu é efectuada através de uma simples extracção com solvente orgânico.⁷⁰

Nesse mesmo ano de 2007, o nosso grupo descreveu um procedimento do mesmo género mas para a resolução de álcoois secundário. Para tal, os autores sintetizaram agentes acilantes iónicos (**24**), isto é, líquidos iónicos baseados em imidazólio em que no término de uma das suas cadeias existe um grupo éster (Esquema

1.16). Estes agentes acilantes iónicos permitem a resolução cinética de álcoois secundários por transesterificação catalisada também pela CALB. A reacção foi executada sob pressão reduzida de modo a remover o etanol que se liberta e deslocar o equilíbrio termodinâmico no sentido dos produtos sem necessitar de um excesso considerável do agente acilante. Após a primeira reacção enzimática, o enantiómero livre é facilmente removido por extracção com solvente orgânico. A recuperação do enantiómero acoplado aos líquidos iónicos é efectuada novamente por transesterificação enzimática, após adição de um pequeno excesso de etanol. Desta forma, o agente acilante iónico é regenerado e, após remoção do enantiómero livre por extracção com solvente orgânico, pode ser reutilizado imediatamente em novo ciclo de resolução.^{71, 72}



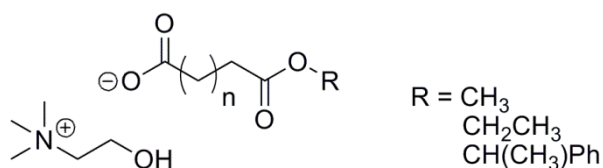
Esquema 1.16 – Metodologia de resolução cinética baseada em agentes acilantes iónicos (24), para a resolução catalisada pela CALB de álcoois secundários. Os produtos e os substratos são separados por simples extracção com solvente orgânico.⁷¹

1.2

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dois últimos exemplos descritos na secção 1.1.4, tal como a grande maioria dos líquidos iónicos, assentam no catião imidazólio, porém este componente levanta questões em termos económicos e de sustentabilidade ambiental. Com isto em mente, nesta tese pretendeu-se desenvolver uma nova família de agentes acilantes iónicos baseados no catião benigno colina e com ácidos dicarboxílicos monoesterificados como contra-ião (Esquema 1.17). Ambos os componentes ou são de baixo custo ou podem ser facilmente preparados de materiais acessíveis. Além disso, são compostos com biocompatibilidade assegurada.^{35, 73, 74} Os líquidos iónicos sintetizados foram depois testados como agentes acilantes iónicos, seguindo uma metodologia de resolução semelhante à descrita anteriormente por esta equipa (Esquema 1.16).^{71, 72}

Procurou-se, também, desenvolver líquidos iónicos com uma estrutura idêntica mas esterificados com um álcool secundário (nomeadamente (\pm)-1-feniletanol (**26**)), para estudar a aplicação deste género de modificação em protocolos de resolução cinética enzimática por hidrólise. Geralmente, estes protocolos apresentam velocidades de reacção superiores às observadas nos procedimentos de resolução por transesterificação, no entanto são intrinsecamente limitados devido à reduzida solubilidade de grande parte dos compostos orgânicos em meios aquosos. A colina, por seu lado, é um catião muito hidrofílico e são abundantes os estudos que demonstram o aumento de solubilidade dos sais de compostos orgânicos de colina em comparação com os seus análogos de sódio ou de potássio.^{46, 58, 75}



Esquema 1.17 – Estrutura geral dos líquidos iónicos sintetizados neste trabalho.

1.2.1 Resolução cinética enzimática por transesterificação

1.2.1.1 Síntese dos precursores e dos líquidos iónicos

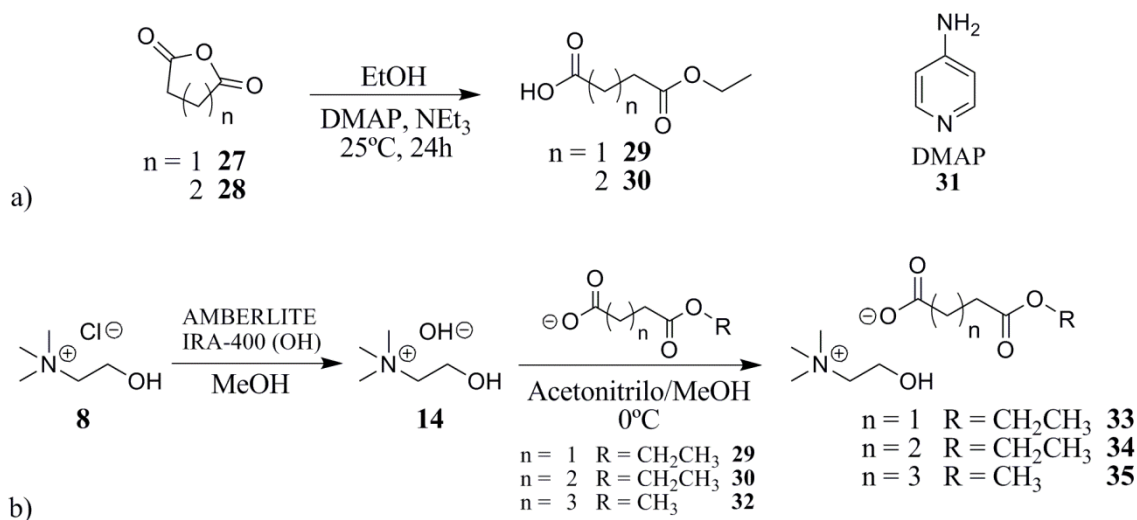
Antes de se proceder à preparação dos líquidos iónicos, foi necessário primeiro sintetizar os respectivos ésteres monoalquílicos de ácidos dicarboxílicos (Esquema 1.18 a)). Estes precursores são constituídos por dois grupos funcionais diferentes, que têm propósitos distintos na molécula: o ácido carboxílico estabelecerá a ligação iónica com a colina, enquanto o grupo éster actuará como agente acilante no processo de resolução enzimática. Sintetizaram-se três precursores com cadeias alifáticas de diferentes tamanhos, de modo a verificar-se se a distância da carga ao agente acilante influencia o reconhecimento e/ou eficiência da reacção enzimática.

Por norma, a monoesterificação de ácidos dicarboxílicos não é um protocolo simples, pois raramente se consegue obter total esterificação do diácido de partida e impedir simultaneamente a esterificação do monoéster. No caso de ácidos carboxílicos de cadeia curta (4 e 5 carbonos) existe uma alternativa muito mais eficiente, nomeadamente a alcoólise do anidrido respectivo. Nesta metodologia, a abertura do anel é efectuada sob condições suaves e, geralmente, catalisada por 4-dimetilaminopiridina (**31**), obtendo-se o monoéster quase exclusivamente. Além disso os anidridos **27** e **28** são materiais de partida de baixo custo e reduzida toxicidade, contribuindo para um procedimento simples e sustentável. Como tal, os precursores **29** e **30** foram obtidos seguindo este método, devendo se salientar ainda que nestes dois casos em particular não foi necessário a adição de nenhum solvente extra, já que o etanol actuou como nucleófilo e como solvente.

Em relação ao ácido dicarboxílico de seis carbonos (ácido adípico), o seu anidrido é muito menos acessível, pelo que o respectivo éster monoetilico teria de ser sintetizado através de uma das várias metodologias descritas na literatura.^{76, 77} No entanto, como existia o análogo metílico (**32**) em *stock* no laboratório, decidiu-se, nesta fase tão prematura do trabalho, utilizar alternativamente esse precursor.

Com os três ésteres monoalquílicos à disposição, prosseguiu-se para a síntese dos líquidos iónicos propriamente ditos. Para tal recorreu-se ao método de neutralização com hidróxido de colina (**14**) preparada *in situ* por metátese com uma resina de troca aniónica (Esquema 1.18 b)). Esta metodologia é vantajosa em relação à metátese

comum pois os aniões halogeneto, conhecidos por desestabilizar determinadas enzimas, ficam retidos na resina. Ademais, a preparação *in situ* de **14** também é vantajosa em termos económicos, em virtude do baixo custo do cloreto de colina (**8**). A única alteração em relação aos protocolos deste tipo mais comuns^{35, 55} prende-se com a necessidade de efectuar a reacção de neutralização sob banho de gelo, no sentido de minimizar a possível hidrólise do éster terminal por parte do anião hidróxido.



Esquema 1.18 – Métodos utilizados para a síntese dos ésteres monoetílicos de ácidos dicarboxílicos (**29** e **30**) e dos líquidos iónicos baseados em colina (**33-35**). O composto **31** foi adquirido previamente.

Seguindo a metodologia esquematizada no Esquema 1.18 b), conseguiu-se obter os líquidos iónicos **33-35** com bons a excelentes rendimentos. Os três compostos encontram-se no estado líquido à temperatura ambiente, algo que era expectável, tendo em conta que Fukaya *et al* observaram que o composto hidrogenossuccinato de colina é um líquido à temperatura ambiente.³⁵ A substituição do ácido carboxílico por um grupo éster contribui para a diminuição da temperatura de cristalização pois limita a formação de pontes de hidrogénio. O facto de serem líquidos à temperatura ambiente é uma propriedade muito interessante pois permite que estes compostos possam actuar simultaneamente como agentes acilantes e como solventes, simplificando o protocolo de resolução. Os compostos **33-35** apresentam viscosidades elevadas, algo que também era esperado. Fukaya *et al* observaram que os líquidos iónicos de colina com diácidos como contra-íão são mais viscosos que os seus análogos baseados, por exemplo, em imidazólio.³⁵ A elevada viscosidade destes compostos pode ser uma série condicionante

na reacção enzimática pois limita os processos de transferência de massa e traduz-se em velocidades de reacção mais lentas.

O teor em água destes líquidos iónicos foi cuidadosamente controlado (entre 1 e 2% p/p), pois trata-se de uma variável fulcral nas reacções de transesterificação, onde a sua actividade define o equilíbrio entre as reacções de hidrólise e de síntese.⁵

1.2.1.2 Ensaio enzimáticos

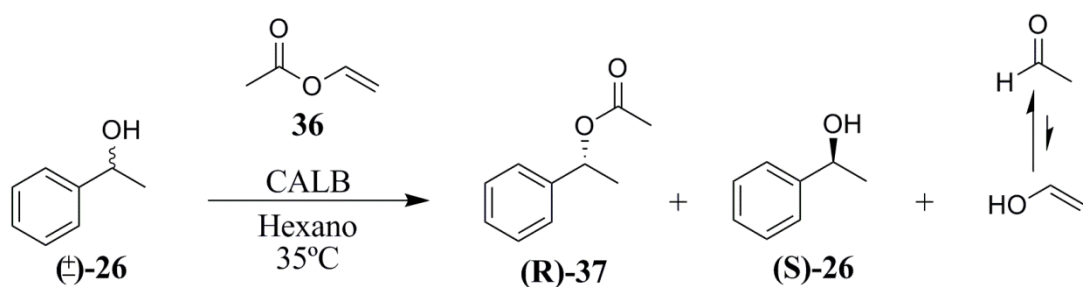
Após a síntese dos líquidos iónicos **33-35**, estudou-se a sua aplicabilidade como novos agentes acilantes. Seguiu-se uma metodologia semelhante à descrita anteriormente por esta equipa (Esquema 1.16), com algumas modificações. Como os compostos **33-35** são líquidos à temperatura ambiente, não é necessário a adição de nenhum solvente. Devido às elevadas viscosidades teve de se utilizar temperaturas reaccionais mais elevadas, entre 35 e 50°C. Como substrato racémico usou-se (\pm)-1-feniletanol (**26**). Trata-se de um álcool secundário modelo para este tipo de processos, pois é um importante material de partida na indústria farmacêutica, agro-alimentar e de produtos naturais.⁷⁸

Infelizmente, mesmo após sete dias de incubação, não ocorreu transesterificação nos agentes acilantes **33** e **34**, e no caso do composto **35** esta foi inferior a 10%. Portanto, apenas ocorreu (alguma) reacção no agente acilante com a maior distância entre os grupos ionizados e o grupo éster. Numa primeira instância, esta observação levou-nos a concluir que a proximidade da colina e/ou do grupo carboxilato ao grupo éster impede o seu reconhecimento pela enzima. De facto, é conhecida a aversão da maioria das enzimas a moléculas carregadas, devido, sobretudo, à existência de cargas no seu sítio activo (Esquema 1.9). Aliás, é devido a esta repulsão que é possível utilizar compostos baseados em colina como solventes em reacções enzimáticas, caso contrário o álcool terminal actuará como nucleófilo.⁴⁸ Por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) confirmou-se que a colina dos agentes acilantes usados nos ensaios enzimáticos não se encontrava esterificada. No entanto, esperava-se que a distância de quatro carbonos entre os grupos ionizados e o grupo éster fosse mais do que suficiente para permitir a sua entrada no sítio activo, tal como foi demonstrado por Naik *et al.*⁷⁰

O trabalho de Kataoka *et al*, publicado durante a execução desta tese, levantou ainda mais questões sobre os resultados obtidos.⁷⁹ Os autores descreveram a resolução cinética, por hidrólise, de álcoois secundários esterificados com anidridos succínico e glutárico. A hidrólise decorre em meio tamponado a pH 6.5, pelo que os ácidos carboxílicos dos respectivos monoésteres encontram-se ionizados. Apesar da proximidade do grupo carboxilato ao grupo éster, a reacção enzimática não só decorre sem problemas como é extremamente enantioselectiva. Estas observações levaram-nos a investigar um pouco mais os agentes acilantes sintetizados, no sentido de averiguar a existência de algum tipo de inibição, desnaturação ou se se trata apenas de um efeito de solvente.

Nesse sentido, procurou-se comparar, para uma reacção modelo, as actividades catalíticas da CALB após ou sem contacto prévio com um dos agentes acilantes iónicos. Como reacção modelo escolheu-se resolução cinética, por transesterificação, de (\pm)-1-feniletanol (**26**) usando acetato de vinilo como agente acilante (**36**) e hexano como solvente (Esquema 1.19). É uma resolução rápida e enantioselectiva pois o álcool vinílico que se liberta tautomeriza em acetaldeído, assegurando a irreversibilidade da reacção e deslocando o equilíbrio no sentido dos produtos.⁵ Como controlo, efectuou-se a reacção controlo com enzima “fresca”. A resolução ficou completa logo após 2 horas de reacção, tendo-se obtido o éster com um ee >99.0% enquanto o álcool remanescente ((**S**)-**26**) apresentava um ee de 98.3%.

Posto isto, executou-se a mesma reacção mas utilizou-se enzima previamente incubada num dos agentes acilantes iónicos, nomeadamente o composto **34**. A incubação foi efectuada durante a noite a 35°C, após a qual se filtrou a enzima de modo a arrastar o mínimo possível de agente acilante. Após 2 horas de reacção o éster (**R**)-**37** apresentava um ee de 98.4%, no entanto o álcool (**S**)-**26** apresentava um ee inferior a 1%. Após 16 horas, observou-se para o álcool remanescente e para o éster ee inferiores a 1% e 93% (conversão < 1%), respectivamente. Portanto a enzima incubada no agente acilante não conseguiu catalisar a reacção modelo com a mesma eficiência da enzima “fresca”, o que indica que a CALB se encontra inibida ou então parcialmente desactivada. De seguida recuperou-se a enzima e lavou-se abundantemente com água. Após uma rápida secagem a pressão reduzida, repetiu-se a reacção modelo nas mesmas condições utilizando a enzima lavada. Após 16 horas obteve-se novamente um ee praticamente nulo para o álcool (**S**)-**26**, apesar de um ee superior a 80% para o éster.



Esquema 1.19 – Reacção modelo utilizada para comparação das actividades catalíticas da CALB após ou sem contacto prévio com um dos agentes acilantes iónicos. Trata-se de uma resolução cinética, por transesterificação, de (±)-1-feniletanol (**26**) usando acetato de vinilo (**36**) como agente acilante.

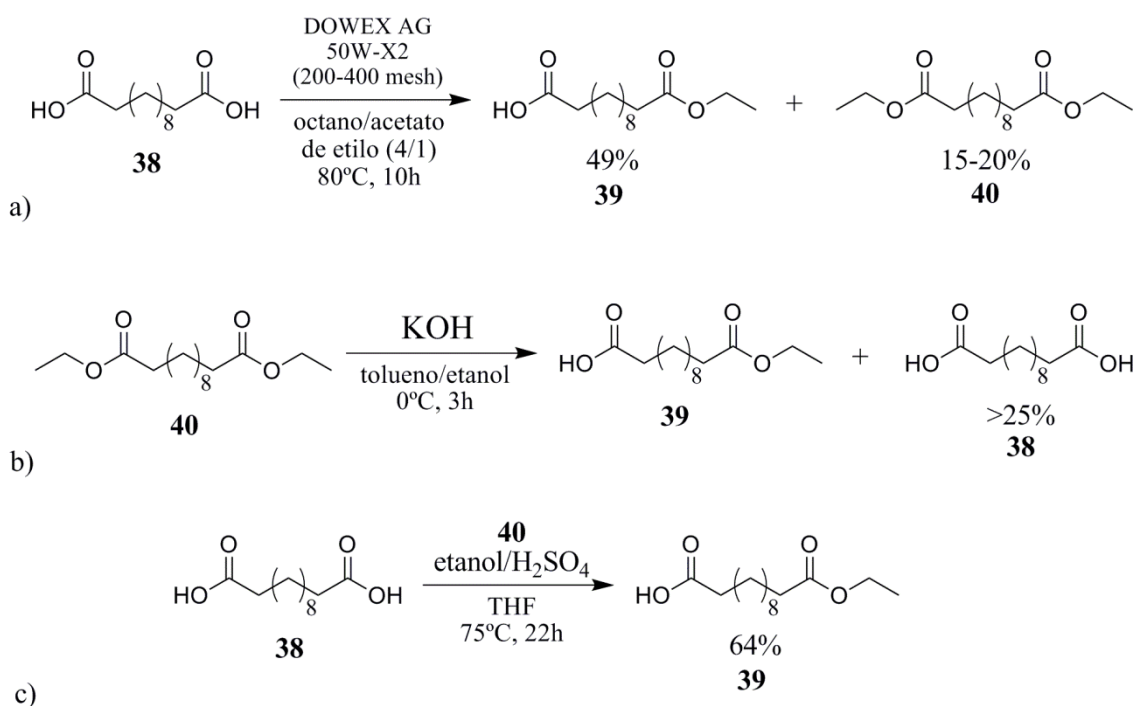
Com base nestes resultados poderíamos concluir que a enzima se encontra praticamente desactivada. Decidiu-se repetir a experiência, exatamente com as mesmas condições e passos, tendo-se obtido precisamente os mesmos resultados. Todavia, uma fracção da enzima recuperada por filtração após a etapa de incubação foi guardada para outro ensaio. Essa amostra de enzima foi incubada novamente com agente acilante **34** mas em D₂O a 37°C. Após 5 horas verificou-se, por RMN, total hidrólise de **34**. Para comparação (ver Anexos), num ensaio semelhante sem CALB, depois de 20 dias de incubação observou-se menos de 5% de hidrólise. Num ensaio semelhante com CALB “fresca”, após 4 horas e meia verificou-se mais de 98% de hidrólise. Por conseguinte podemos afirmar que a CALB incubada em agente acilante não se encontra desnaturada.

É, portanto, necessária uma investigação mais profunda para perceber a real interacção entre os líquidos iónicos **33-35** e a CALB.

1.2.1.3 Preparação de um agente acilante iónico de cadeia longa

Face aos resultados obtidos, ficou claro que a distância entre a colina e o grupo éster é crítica para o seu normal reconhecimento enzimático. De modo a garantir uma distância considerável entre os grupos funcionais, procurou-se sintetizar um novo agente acilante do mesmo género a partir de um ácido dicarboxílico de cadeia longa. O ácido escolhido foi o ácido dodecanodióico (**38**), com dez átomos de carbono entre as funções ácido carboxílico, pois também se trata de um composto de baixo custo e biocompatível.⁷⁴

Como já foi referido anteriormente, a síntese de ésteres monoalquílicos de ácidos dicarboxílicos não é um procedimento simples. São várias as metodologias disponíveis, das quais a monoesterificação selectiva por catálise heterogénea e a monohidrólise de diésteres são as mais comuns.^{76, 80, 81} A primeira baseia-se na transesterificação por acidólise em meio orgânico (éster/hidrocarboneto) catalisada por uma resina funcionalizada com ácidos sulfónicos. Este tipo de resinas encontra-se extremamente hidratado (50-80% p/p de água), pelo que a reacção de transesterificação ocorre na interface entre a água à superfície da resina e o meio orgânico. A selectividade observada deve-se à maior propensão dos diácidos para o interface água/fase orgânica, enquanto o monoéster permanece preferencialmente no meio orgânico. Em primeira instância, recorreu-se a esta metodologia para a síntese do éster monoetílico (**39**) precursor (Esquema 1.20 a)). Apesar de se alcançar total consumo do diácido de partida, não se conseguiu evitar a formação também de diéster (**40**) em quantidade razoável (15-20%). Quando se procurou diminuir o tempo de reacção, a esterificação de **38** não foi completa. Todavia, é preferível um consumo total do diácido, à custa do rendimento final, pois a separação entre o monoéster e o diéster é facilmente efectuada por extracção básica. A menor selectividade observada, em comparação com a descrita na literatura, pode dever-se ao facto do éster etílico não induzir diferenças tão significativas na polaridade do monoéster em comparação com o diácido.



Esquema 1.20 – Metodologias usadas para a síntese de hidrogenododecanodioato de etilo (**39**).

Apesar da metodologia anterior permitir a preparação de **39** puro sem recorrer a técnicas cromatográficas, os rendimentos foram sempre moderados (entre 40 e 50%). Por este motivo, decidiu-se experimentar outros protocolos, nomeadamente a mono-hidrólise de diésteres com hidróxido de sódio ou de potássio (Esquema 1.20 b)). Esta reacção é executada em solvente orgânico, por exemplo tolueno, e, geralmente, sob banho de gelo. Idealmente, após a hidrólise de um dos grupos éster, o sal formado é insolúvel no solvente orgânico, levando à sua precipitação e impedindo a hidrólise do monoéster. Esta metodologia, no entanto, revelou ser pouco eficiente (formou-se mais de 20% de diácido), por isso foi rapidamente abandonada.

Por último, recorreu-se a um procedimento menos conhecido, em que se efectua uma normal esterificação do diácido, catalisada por ácido inorgânico, mas “envenenada” com o diéster respectivo (Esquema 1.20 c)).^{82, 83} Deste modo a esterificação do monoéster é desfavorecida pela presença do produto, podendo se utilizar um excesso de álcool de modo a converter-se por completo o diácido de partida. Após optimização das condições experimentais, conseguiu-se obter o éster monoetílico com bons rendimentos (>60%) e, geralmente, sem ser necessário purificação por técnicas cromatográficas.

Seguindo a mesma metodologia anterior (Esquema 1.18 b)) obteve-se o composto dodecanodioato de etilo e colina (**41**) com um bom rendimento (81%). Este líquido iónico, ao contrário dos sintetizados anteriormente, é um sólido à temperatura ambiente. Apresenta, contudo, um ponto de fusão baixo, pois o composto funde com a temperatura corporal. No sentido de determinar as temperaturas de transição, caracterizou-se o líquido iónico **41** por calorimetria diferencial de varrimento (DSC). Como podemos ver na Figura 1, a DSC confirmou o baixo ponto de fusão de **41**, entre 30 e 35°C. A Figura 1 também demonstra que o composto dodecanodioato de etilo e colina apresenta um forte efeito de sobrearrefecimento, isto é, um grande intervalo (mais de 40°C) entre a temperatura de fusão e a de cristalização. Este fenómeno é extremamente comum nos líquidos iónicos devido ao difícil empacotamento dos seus iões, que dificulta a formação da rede cristalina.⁸⁴ Face à baixa temperatura de fusão do líquido iónico **41**, também este composto poderá ser utilizado simultaneamente como agente acilante iónico e como solvente na generalidade dos procedimentos de resolução, onde as temperaturas reaccionais sejam de pelo menos 35°C.

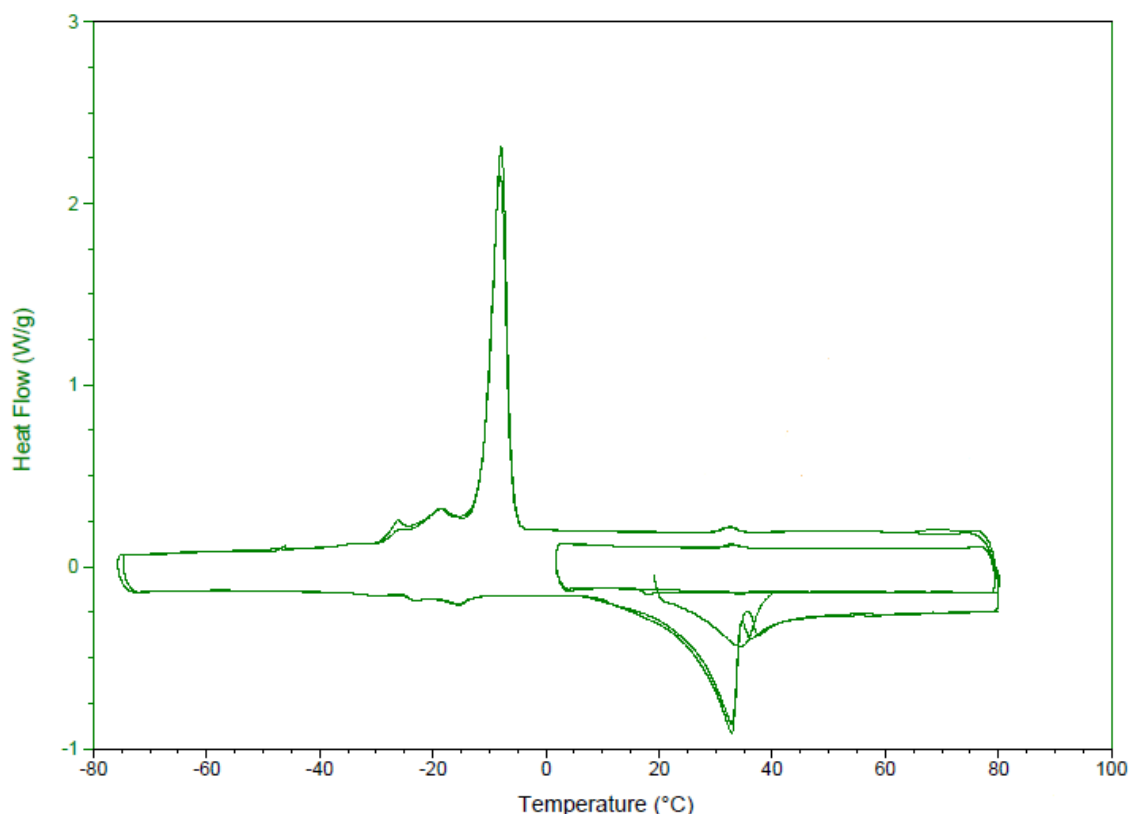


Figura 1 – Representação gráfica da análise por calorimetria de varrimento diferencial (DSC) do líquido iônico dodecanodioato de etilo e colina (**41**), a temperaturas entre -80 e 80°C.

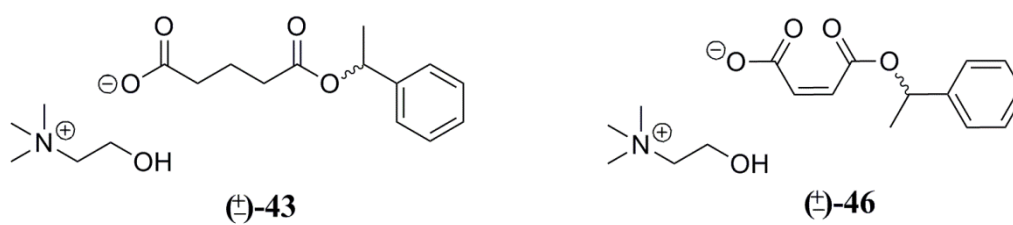
1.2.2 Resolução cinética enzimática por hidrólise

1.2.2.1 Síntese dos precursores e dos líquidos iônicos

Em virtude do baixo custo dos materiais de partida utilizados na síntese dos agentes acilantes iônicos **33-35**, procurou-se aplicar este género de estrutura para protocolos de resolução cinética por hidrólise. Tal como Naik *et al* demonstraram anteriormente, o acoplamento de racematos a líquidos iônicos permite uma fácil separação entre o produto da resolução e o material de partida que não reage.⁷⁰ A nossa metodologia tem como moléculas-alvo álcoois secundários, que são precisamente o tipo de misturas racémicas que geralmente necessitam de purificação por técnicas cromatográficas. A principal vantagem, além do baixo custo e biocompatibilidade dos seus componentes iónicos, são a hidrofiliicidade da colina que permite a solubilização em água de moléculas extremamente hidrofóbicas.^{46, 58, 75}

Para este estudo prepararam-se dois líquidos iónicos (Esquema 1.21). Para a síntese de hidrogenoglutarato de (\pm)-1-feniletilo (**42**) seguiu-se uma metodologia idêntica à descrita anteriormente para **29** e **30**: esterificação do álcool (secundário) com anidrido, catalisada por DMAP (**31**). Escolheu-se (\pm)-1-feniletanol (**26**) como molécula modelo por se tratar de um importante intermediário para várias Indústrias.⁷⁸ A síntese de hidrogenomaleato de (\pm)-1-feniletilo (**45**), no entanto, não pode ser efectuada através da mesma metodologia, pois o anidrido maleico (**44**) é degradado por aminas e piridinas. Como tal, executou-se a esterificação de (\pm)-**26** sob aquecimento (100-105°C) com um pequeno excesso de **44**. A síntese dos líquidos iónicos **43** e **46** procedeu-se novamente através da neutralização dos respectivos monoésteres precursores com hidróxido de colina (**14**).

Ambos os compostos encontram-se no estado líquido à temperatura ambiente.



Esquema 1.21 – Líquidos iónicos sintetizados neste trabalho para aplicação em metodologias de resolução cinética enzimática por hidrólise.

1.2.2.2 Ensaio enzimáticos

Finalizada a síntese do líquido iónico **43**, estudou-se a sua aplicação num processo de resolução cinética enzimática por hidrólise. Como já foi referido anteriormente, durante o decorrer desta tese, foi publicado um trabalho por Kataoka *et al*, onde é descrita a resolução cinética por hidrólise de monoésteres de álcoois secundários, idênticos aos precursores utilizados no nosso trabalho para a síntese dos líquidos iónicos.⁷⁹ Como é óbvio, estes monoésteres são pouco solúveis em água e, por esse motivo, os autores tiveram de recorrer a soluções tamponadas a pH 6.5 de modo a que os substratos fossem solubilizados. E, mesmo assim, os autores tiveram de utilizar soluções extremamente diluídas (concentração de substrato <0.01 M). Devido a estes resultados, o aumento de complexidade introduzida com a preparação dos líquidos

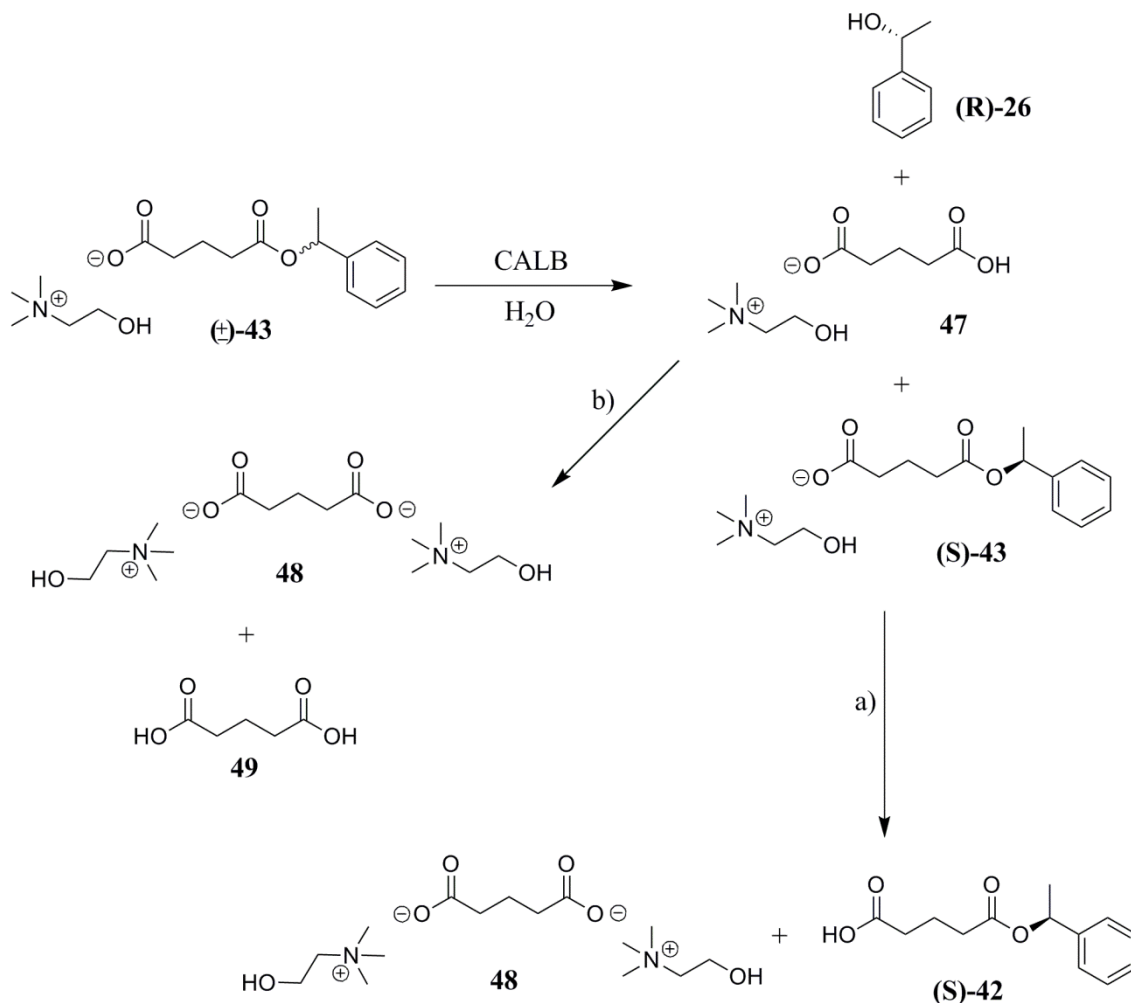
iónicos, a partir dos monoésteres, só é competitivo se se conseguir aumentar de forma considerável a solubilidade destes em meios aquosos.

Como esperado, a hidrofiliabilidade da colina contribui para total solubilização do líquido iónico **43** em água. Seguindo, como ponto de partida, razões de substrato/solvente/enzima descritos anteriormente pelo nosso grupo,⁷² no primeiro ensaio enzimático (não optimizado) utilizou-se uma concentração de substrato superior a 0.74 M. Seguiu-se o decorrer da reacção por GC, tendo-se obtido os melhores resultados logo após 2 horas de incubação. Para o álcool livre obteve-se um ee >99%, enquanto o substrato remanescente apresentava um ee de 75%, o que corresponde a uma conversão de 43% (sendo 50% o máximo teórico).

Repetiu-se a reacção com o objectivo de determinar os seus rendimentos reais, no entanto obtiveram-se resultados completamente fora do esperado. Após extracção da solução aquosa com éter dietílico, a massa dos produtos na fase orgânica era consideravelmente maior do que o previsto. Por CCF verificou-se a presença de três componentes: (R)-1-feniletanol (**26**), (S)-monoéster (**42**) não ionizado e diéster (principalmente (R,R)). Em primeira instância, considerou-se que estes resultados poderiam ser explicados pela proximidade entre os pKas do ácido conjugado do grupo carboxilato (≈ 5.8)⁸⁵ do líquido iónico **43** e do grupo ácido carboxílico (≈ 5.0)⁸⁶ do líquido iónico **47** que se forma (Esquema 1.22 a)). O nosso grupo já observou reorganizações entre ácidos carboxílicos, que aparentemente se devem a diferenças nos seus pKas.⁵⁵ Por este motivo, sintetizou-se o líquido iónico **46**. O segundo pKa do ácido maleico é próximo de 6.0,⁸⁶ enquanto os pKas dos seus monoésteres são próximos de 3.0,⁸⁷ ou seja, o monoéster não deverá ser protonado pelo diácido. Seguiu-se a mesma metodologia usada na resolução do composto **43**, contudo os resultados foram semelhantes, isto é, também se observou a presença de monoéster não ionizado. De referir que não a hidrólise não foi enantioselectiva. O grupo éster do líquido iónico **46** não é estável em água, tendo-se observado hidrólise química significativa.

Com base nestes resultados, e noutros observados entretanto, verificou-se que a diferença de pKas não é a causa fundamental para a reorganização dos grupos ionizados. Os dados obtidos até ao momento indicam que a força motriz por detrás destas reorganizações deverá ser a geração de uma molécula não carregada e outra ionizada a partir de duas moléculas carregadas. Além disso, apontam para a existência

de outra via de reorganização, nomeadamente entre duas moléculas idênticas, tal como exemplificado no Esquema 1.22 b).



Esquema 1.22 – Representação da reacção de resolução cinética enzimática por hidrólise do líquido iónico (±)-43, e das possíveis reorganizações entre as moléculas ionizadas em solução.

Apesar de interessantes, os resultados obtidos mostram que a metodologia idealizada não é viável nesses moldes. A formação inesperada de outras moléculas não carregadas, designadamente o monoéster precursor e o diéster, impossibilita por completo a recuperação do álcool secundário através de uma simples extracção com solvente orgânico. Ou seja, inviabiliza a principal vantagem do acoplamento de misturas racémicas a líquidos iónicos.

1.3

CONCLUSÕES

Sintetizaram-se, com bons rendimentos, líquidos iónicos baseados em colina e com ésteres monoalquílicos de ácido succínico, glutárico e adípico como contra-íão. Os três compostos encontram-se no estado líquido à temperatura ambiente. Estes compostos foram testados como novos agentes acilantes iónicos, sem necessidade de outros solventes, em reacções de resolução cinética por transesterificação catalisada pela CALB. Infelizmente não se observou transesterificação para nenhum dos líquidos iónicos, apesar de se ter demonstrado que não ocorre desnaturação da enzima. A natureza da interacção entre a enzima e os agentes acilantes sintetizados será estudada com mais detalhe futuramente.

Sintetizou-se, com bom rendimento também, um quarto agente acilante iónico com a mesma estrutura geral mas com uma maior distância entre o grupo carboxilato e a função éster. Este composto é um sólido à temperatura ambiente, todavia, apresenta um baixo ponto de fusão, pelo que também poderá actuar simultaneamente como próprio solvente. As próximas etapas consistem em estudar a sua aplicação em processos de resolução cinética e, caso seja bem-sucedida, optimizar as condições experimentais para diversos álcoois secundários.

Por último, prepararam-se dois líquidos iónicos com a mesma estrutura geral mas esterificados com um álcool secundário ((±)-1-feniletanol). Tal como esperado, estes sais de colina são completamente solúveis em água. Contudo, a sua aplicação em processos de resolução cinética por hidrólise catalisada pela CALB não teve sucesso. Observou-se uma reorganização dos grupos ionizados das moléculas em solução que dificulta a separação dos produtos e dos materiais de partida.

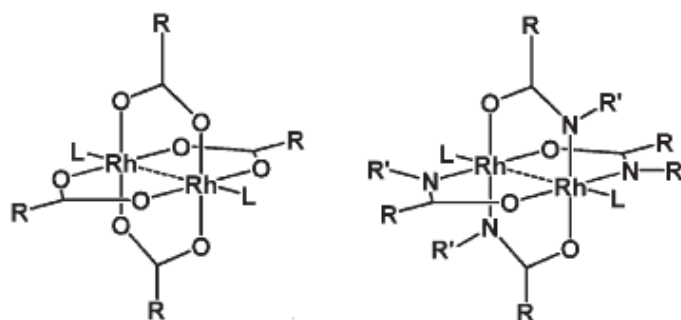
CAPÍTULO II

SÍNTESE DE NOVOS COMPLEXOS METÁLICOS PARA APLICAÇÕES CATALÍTICAS E COM POTENCIAL ACTIVIDADE BIOLÓGICA

2.1

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, os complexos de dirródio(II) tornaram-se uma ferramenta indispensável na área da síntese orgânica devido às inúmeras e eficientes transformações químicas catalisadas por esta singular família de compostos. O sucesso destes catalisadores assenta essencialmente na sua estrutura bimetalica. De uma forma geral, os complexos de dirródio(II) apresentam uma ligação Rh-Rh e são constituídos por quatro ligandos em ponte (posições equatoriais) e dois pontos de coordenação cataliticamente activos (posições axiais), dispostos numa característica geometria em “roda de pás” (Esquema 2.1). Os ligandos são responsáveis não só pela electrofilicidade do catalisador, e subsequente reactividade, como também pela indução de assimetria no(s) produto(s) obtido(s). Por estes motivos é possível configurar as propriedades dos complexos de dirródio(II) através da modificação dos seus ligandos. A alteração dos ligandos nas posições equatoriais tem sido a principal estratégia no desenvolvimento de novos catalisadores, apesar de uma melhor compreensão da influência dos ligandos axiais ter aumentado o interesse nestas posições nos últimos anos.⁸⁸⁻⁹⁰



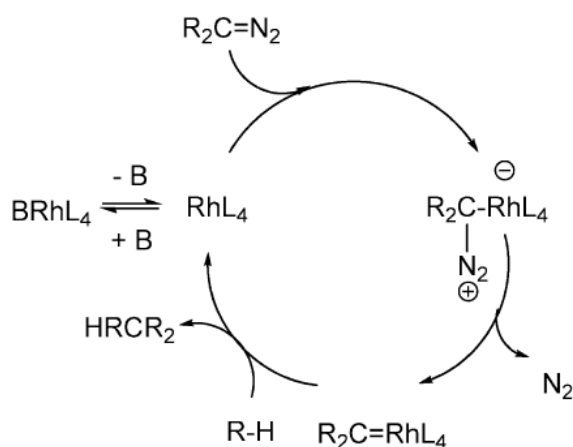
Esquema 2.1 – Estrutura geral das duas famílias de complexos de dirródio(II) mais comuns, baseadas em ligandos carboxilato e carboxamida respectivamente. L representa os ligandos axiais, geralmente moléculas do solvente.⁹⁰

2.1.1 Aplicações catalíticas

Os complexos de ródio(II) são catalisadores excepcionais em inúmeras transformações químicas. Estes compostos, a maioria estáveis ao ar e à humidade, são particularmente reactivos, eficientes e selectivos em várias reacções sintéticas de interesse, sobretudo para formação de ligações carbono-carbono. Do amplo espectro de metodologias desenvolvidas destacam-se a inserção de carbenos e nitrenos a ligações C-H (bem como a ligações O-H, N-H e S-H no caso de carbenos), as reacções de ciclopropanação, de ciclopropenação e de cicloadição.^{88, 91-93}

A principal aplicação catalítica desta família de complexos tem como objectivo a geração de metalocarbenos, na grande maioria dos casos a partir de compostos diazo. A título de exemplo, o mecanismo aceite actualmente para a reacção de inserção a ligações R-H consiste em três etapas (Esquema 2.2): 1) descoordenação das moléculas de solvente (B) em posição axial e ataque do composto diazo ao catalisador; 2) subsequente libertação de azoto molecular e formação do dito metalocarbeno; 3) ataque deste último a uma ligação electronicamente rica R-H, obtendo-se o produto e regenerando o catalisador. A ligação Rh-Rh é crucial para o desempenho destes complexos diméricos na formação e reactividade dos metalocarbenos (ou metalonitrenos). Qualquer alteração electrónica no átomo metálico onde ocorre a geração do carbeno (ou nitreno) é compensada pelo átomo de ródio adjacente.^{88, 91}

Estes complexos actuam ainda segundo outros perfis catalíticos, por exemplo como ácidos de Lewis, quando aplicados noutras transformações químicas como reacções de oxidação, de cicloadição ou em rearranjos sigmatrópicos.^{90, 92-94}



Esquema 2.2 – Ciclo catalítico proposto para as transformações de inserção de compostos diazo a ligações R-H.⁸⁸

Apesar da sua importância para a síntese orgânica, a utilização de catalisadores baseados em ródio cinge-se sobretudo à indústria automóvel, havendo poucos exemplos na indústria química. O principal obstáculo à sua aplicação prende-se com o elevadíssimo preço deste elemento, cerca de 15 e 20% mais dispendioso do que a platina e o ouro, respectivamente. No sentido de contrabalançar este facto, tem-se procurado desenvolver metodologias que facilitem a recuperação e reutilização dos catalisadores metálicos.⁹⁰

Existem dois tipos de estratégias, baseadas em sistemas homogéneos ou heterogéneos, cada uma com benefícios e desvantagens. As metodologias heterogéneas assentam essencialmente no acoplamento dos complexos a polímeros orgânicos ou inorgânicos. A interacção com os polímeros pode ser efectuada de várias formas (ligação covalente, pares iónicos) e através de diferentes funções do catalisador (ligação por ou a um ligando em ponte, coordenação axial). Uma alternativa bem menos comum baseia-se no encapsulamento dos complexos em matrizes inorgânicas porosas. Este género de estratégias permite uma fácil recuperação dos catalisadores por filtração ou precipitação. A principal desvantagem consiste na possível perda de actividade catalítica, reprodutibilidade e/ou selectividade, em virtude da alteração das propriedades do complexo inicial com a ligação ao polímero.^{90, 95}

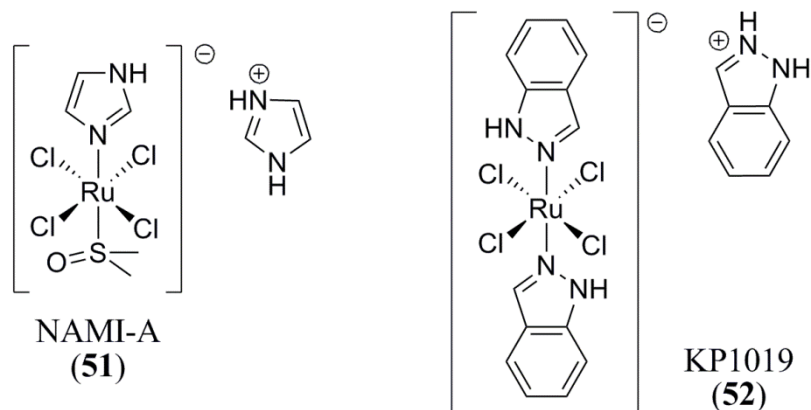
O segundo tipo de estratégia faz uso de solventes não-convencionais, designadamente líquidos iónicos, água ou fluídos supercríticos, de modo a reutilizar-se os complexos metálicos. Enquanto o catalisador e os substratos são solúveis no solvente utilizado, apenas os produtos (e eventuais materiais de partida remanescentes) são recolhidos após extracção com um solvente imiscível. O catalisador permanece no solvente não-convencional, pronto para novo ciclo catalítico. De todos os solventes mencionados, a água é o mais atraente, pois trata-se de uma substância abundante, de baixo custo, com impacto ambiental nulo e imiscível com uma grande variedade de solventes. Em termos de vantagens, como o complexo não sofre nenhum tipo de modificação, as suas propriedades catalíticas permanecem inalteradas. Além disso, não requer passos adicionais, o que diminui os custos associados à síntese do catalisador. As principais desvantagens residem na necessidade de construção de um catalisador que apresente simultaneamente as propriedades catalíticas e as solubilidades adequadas, e na disponibilidade de um solvente não-convencional capaz de solubilizar os materiais de partida e o complexo metálico, mas que não interfira com a reacção de interesse.^{89, 90, 96}

2.1.2 Aplicações farmacêuticas

A catálise é, sem dúvida, o principal foco de investigação e utilização dos complexos de ródio(II), no entanto as propriedades destes compostos têm permitido a sua aplicação noutras áreas, em particular como agentes anti-tumorais.^{90, 97, 98}

Devido às limitações do uso da cisplatina no tratamento do cancro, designadamente a sua toxicidade para os rins e sistema nervoso, bem como desenvolvimento de resistência farmacológica, tem-se intensificado a procura de novos fármacos com outros centros metálicos, tais como ruténio ou ródio. O uso destes metais de transição é vantajoso, em comparação com a platina, na medida em que apresentam 1) pontos de coordenação adicionais, 2) vários estados de oxidação, 3) diversidade de geometrias, 4) melhores solubilidades e 5) permitem o desenvolvimento de estratégias terapêuticas fotodinâmicas.⁹⁸⁻¹⁰⁰ De referir que dois fármacos baseados em ruténio, NAMI-A e KP1019 (Esquema 2.3), já entraram em testes clínicos, um como agente anti-metastático, o segundo com capacidade para reduzir o crescimento tumoral por indução apoptótica.^{101, 102}

Apesar de não existir ainda nenhum complexo de ródio em ensaios clínicos, já foi demonstrado que esta família de compostos apresenta actividade contra vários tipos de tumores. Estudos sobre o mecanismo de acção destes complexos indicam a formação de adutos com o DNA, bem como a inibição da replicação deste ácido nucleico.^{98, 99, 103} Contudo nem sempre os efeitos citotóxicos observados estão em consonância com este tipo de interacção, pelo que poderão existir outros modos de acção, nomeadamente através de ligação irreversível a proteínas com grupos tiol livres próximos do sítio activo.^{98, 104}



Esquema 2.3 – Estruturas de dois fármacos metálicos, NAMI-A (**51**) e KP1019 (**52**), que entraram em testes clínicos.^{101, 102}

2.1.3 Preparação de complexos de dirródio(II)

O considerável desenvolvimento de metodologias sintéticas baseadas em complexos de dirródio(II), bem como de muitas e diversas aplicações noutras áreas, deve-se à existência de vários métodos simples e quantitativos de troca de ligandos. Estes métodos permitem a obtenção de compostos com grande variedade estrutural e inclusive com ligandos mistos, o que, por seu turno, se reflete numa assinalável capacidade de modelação das propriedades dos complexos, consoante as necessidades do operador.⁸⁸

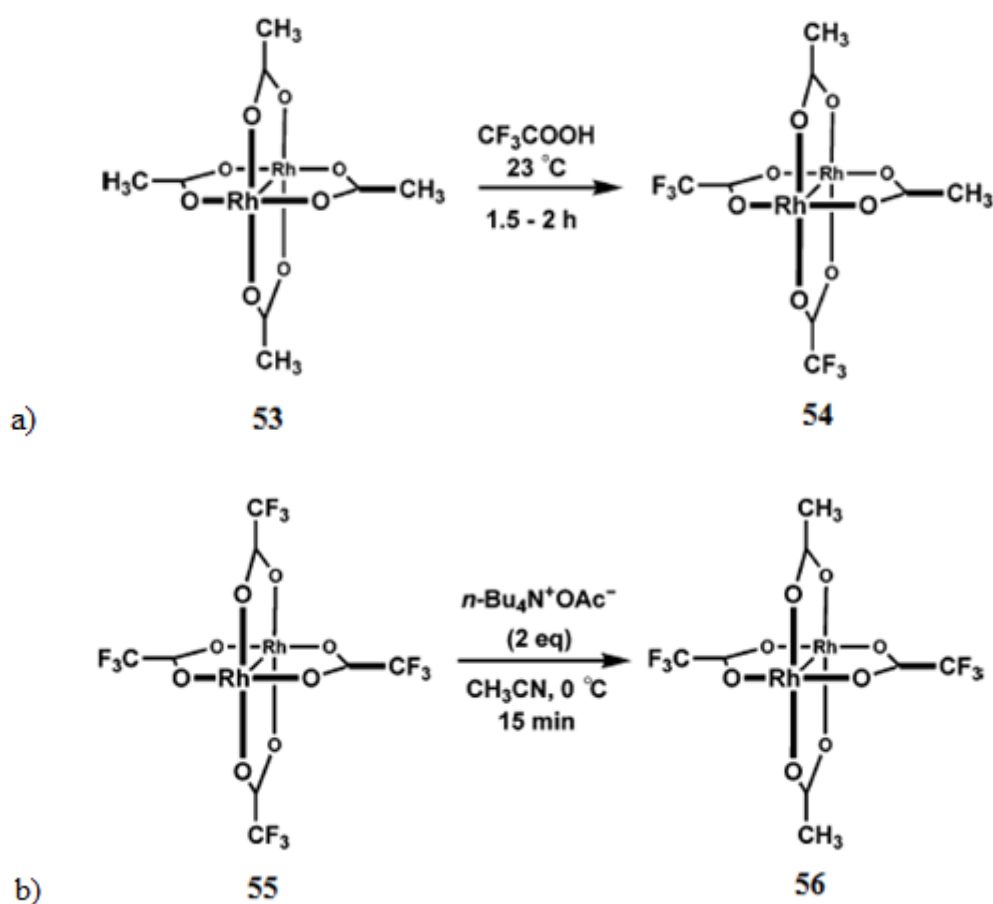
O precursor mais acessível e, por isso, mais utilizado para a troca de ligandos é, sem dúvida, o dirródio tetra-acetato ($\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$) (**53**). O método mais eficiente para a sua síntese consiste na redução de $\text{RhCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ na presença de uma mistura de acetato de sódio e ácido acético, em etanol sob atmosfera inerte. Este método também pode ser aplicado na síntese de outros complexos de dirródio tetra-carboxilato, no entanto os rendimentos são menores.¹⁰⁵

O método mais comum para a troca de ligandos assenta no aquecimento sob refluxo de $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ (**53**) com um excesso do ligando desejado e uma base, num solvente apropriado (normalmente clorobenzeno). Seguindo este protocolo já foram descritos inúmeros complexos com diversos tipos de ligandos e recorrendo a diferentes átomos de coordenação, como oxigénio, azoto, carbono, enxofre ou fósforo. Dos vários tipos de ligandos utilizados, os carboxilatos e carboxamida são os mais comuns (Esquema 2.1).^{88, 105} Um método também muito utilizado faz uso de dirródio tetra-carbonato como precursor. Esta metodologia é muito semelhante à anterior, no entanto requer temperaturas reaccionais mais amenas, pois a libertação de dióxido de carbono desloca o equilíbrio no sentido dos produtos.^{96, 105}

Apesar da sua popularidade, os dois métodos anteriores não são viáveis quando os ligandos que se deseja coordenar são sensíveis ou de síntese complexa/dispendiosa. Desenvolveram-se, por isso, metodologias com precursores activados (Esquema 2.4). Estes materiais de partida permitem o uso de condições reaccionais suaves e de quantidades estequiométricas (ou de um ligeiro excesso) do ligando. Além disso também permitem o controlo do padrão de substituição do produto, o que facilita a caracterização estrutural dos complexos. A síntese destes materiais de partida tem por base duas metodologias complementares. Uma permite a preparação do precursor

activado nas posições cis (Esquema 2.4 a)), enquanto a outra permite a preparação do trans (Esquema 2.4 b)). Na síntese do composto **54**, após a primeira substituição, o ligando acetato em posição trans relativamente ao ligando trifluoroacetato fica mais firmemente ligado ao complexo, devido ao efeito indutivo do ligando trifluoroacetato. Por este motivo, a segunda substituição numa das posições cis é favorecida. No caso do composto **56**, após a primeira troca, o ligando trifluoroacetato em posição trans relativamente ao ligando acetato apresenta uma ligação mais fraca, comparativamente aos outros dois ligandos trifluoroacetato, pois o acetato não exerce um efeito de atracção tão forte sobre o ligando contrário^{106, 107}

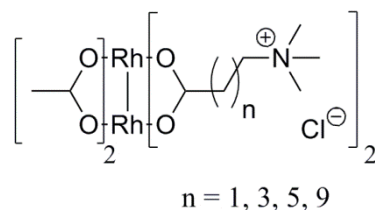
Por seu turno, os compostos **54** e **56** permitem uma fácil introdução de ligandos num padrão de substituição conhecido, já que os trifluoroacetatos são substancialmente melhores grupos de saída devido à estabilização da carga negativa por efeito indutivo.¹⁰⁶



Esquema 2.4 – Preparação dos precursores activados a) cis-Rh₂(OAc)₂(OCOCF₃)₂ (**54**) e b) trans-Rh₂(OAc)₂(OCOCF₃)₂ (**56**).¹⁰⁶

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os novos complexos metálicos iónicos são constituídos por sais de amónio trimetilalquílicos, encontrando-se a cadeia longa funcionalizada com um ácido carboxílico terminal. Os sais de amónios deste tipo são genericamente denominados de betaínas. Este género de complexos metálicos tem sido pouco explorado^{90, 109} e os escassos exemplos com ródio descritos na literatura envolvem essencialmente sais de imidazólio.⁹⁶



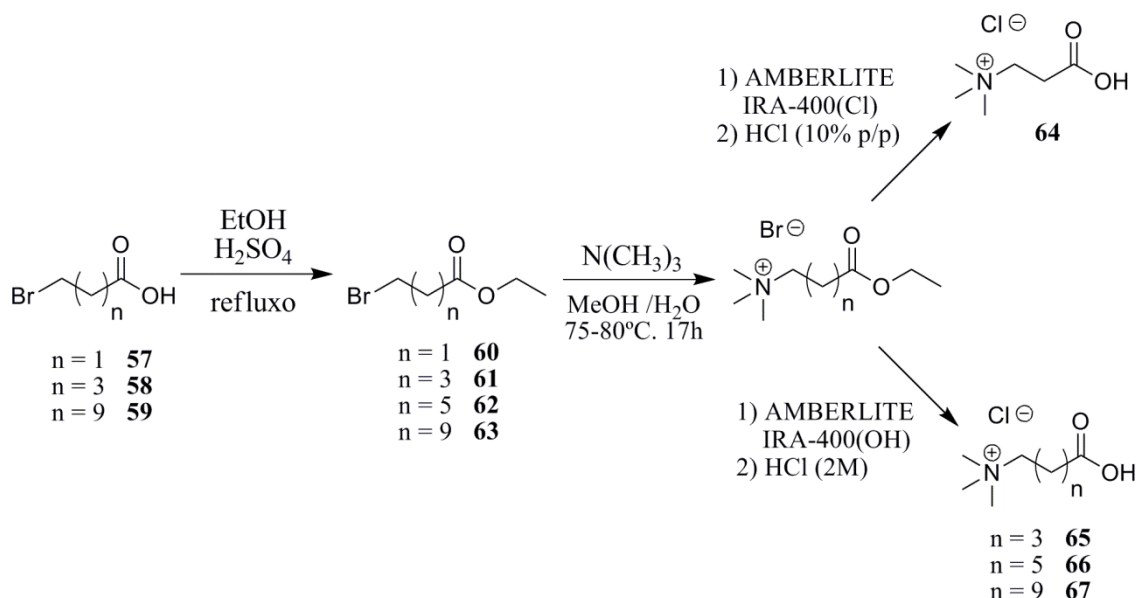
Esquema 2.5 – Estrutura geral dos complexos metálicos iônicos sintetizados.

2.2.1 Preparação dos ligandos

A metodologia mais comum para a síntese de betaínas consiste na quaternização de trimetilamina com ω -halogenoalcanoatos de alquilo e posterior hidrólise do grupo

éster. Ao contrário de outras bases azotadas, como por exemplo 1-metilimidazole,⁹⁶ a quaternização não pode ser efectuada imediatamente a partir do respectivo ácido pois as trialquilaminas são bases mais fortes e, devido à sua protonação, ficariam praticamente bloqueadas, o que se traduziria em velocidades de reacção extremamente lentas.

Com isto em mente, desenhou-se uma metodologia, com três etapas, para a síntese das betaínas a partir dos ácidos ω -bromoalcanóicos existentes no nosso laboratório (Esquema 2.6). Procurou-se sintetizar betaínas com cadeias alquílicas de vários tamanhos, entre três e onze átomos de carbonos, pois a interacção com o DNA e com os lípidos membranares depende não só da carga mas também da adequada lipofilicidade dos complexos.^{103, 108}



Esquema 2.6 – Metodologia usada para a síntese das betaínas **64-67**. Os ω -bromoalcanoatos de etilo **60**, **61** e **63** foram preparados por esterificação dos respectivos ω -bromoácidos (**57-59**). O éster **62** foi adquirido previamente. Após quaternização da trimetilamina, procedeu-se à hidrólise dos ésteres iónicos.

O primeiro passo consistiu numa simples esterificação dos ω -bromoácidos **57-59** com etanol, catalisada por um ácido inorgânico. De seguida, procedeu-se à quaternização da trimetilamina com os ω -bromoalcanoatos de etilo sintetizados (**60**, **61** e **63**) bem como os disponíveis no laboratório (**62**). Estas reacções de quaternização são exemplos típicos da reacção de Menshutkin. Os ésteres iónicos resultantes não foram isolados, tendo-se procedido para a etapa de hidrólise imediatamente após a lavagem da mistura com éter dietílico. Para efectuar a hidrólise dos ésteres iónicos com uma cadeia

superior a três carbonos recorreu-se a uma resina de troca aniônica com aniões hidróxido. A passagem pela resina leva à substituição dos aniões brometo pelos aniões hidróxido, que eventualmente hidrolisam a função éster, formando-se um zwitterião. O sal cloreto é obtido após acidificação com HCl (2M). Este protocolo não pode ser aplicado para a obtenção da betaína **64** (cadeia de três carbonos) porque favorece a eliminação de Hoffmann, obtendo-se trimetilamina e acrilato de etilo.¹¹⁰ Optou-se invés por um protocolo de hidrólise com ácido clorídrico concentrado.¹¹¹

Os sais de betaínas sintetizados, com bons a moderados rendimentos, são sólidos cristalinos à temperatura ambiente, típico de halogenetos de amônio tetra-alquílicos.¹¹²

2.2.2 Preparação dos complexos metálicos

De modo a sintetizar os novos complexos iónicos optou-se pelo método de troca via $\text{cis-Rh}_2(\text{OAc})_2(\text{OCOCF}_3)_2$ (**54**). Este método permite uma troca de ligandos sob condições amenas e a obtenção de produtos com padrões de substituição conhecidos. Seguindo o protocolo descrito na literatura (Esquema 2.4 a)),¹⁰⁶ obteve-se o composto **54** com um rendimento superior a 72%. De referir que os complexos mono-substituídos e tri-substituídos também podem ser isolados (3-10% de rendimento), e poderão ser úteis no futuro para a síntese de complexos semelhantes aos descritos neste trabalho mas com cargas diferentes.

Em relação à etapa de introdução das betaínas, tiveram de ser efectuadas algumas alterações em relação aos protocolos mais comuns na literatura, particularmente em relação ao pH do meio reaccional.^{106, 107} O grupo carboxilato é um nucleófilo mais forte do que a função ácido carboxílico, pelo que o pH do meio aquoso utilizado como solvente foi ajustado tendo em conta os pKas das betaínas sintetizadas. Quanto maior for a distância entre o átomo de azoto quaternário e a função ácida maior será o pKa e mais próximo será do ácido alcanóico correspondente. Uma das betaínas apresenta uma cadeia longa (**67**), pelo que seu pKa deverá ser próximo de 4.90 (pKa do ácido decanóico).¹¹³ Os pKas das betaínas mais curtas (**64-66**) serão seguramente menores ou no máximo semelhantes a este valor. De modo a garantir que todas as betaínas se encontravam desprotonadas no meio reaccional utilizou-se uma solução tampão de fosfato (0.01M) com pH 7.5.

De uma forma geral a reacção de troca consistiu no aquecimento de uma solução aquosa de uma das betaínas (**64-67**) e de **54**, em quantidades estequiométricas, a 45-50°C sob atmosfera inerte. O precursor de ródio, de cor roxa, é praticamente insolúvel no meio aquoso, sendo o seu desaparecimento uma indicação da evolução da primeira substituição. A solução aquosa, incolor no início da reacção, adquire uma cor azul-esverdeada após 2-3 horas de aquecimento. A segunda substituição revelou, no entanto, ser muito mais demorada, em virtude, provavelmente, da repulsão entre cargas. Mesmo após 12 horas de reacção ainda se detectaram quantidades razoáveis de ligando livre. Em primeira instância, procurou-se purificar o complexo a partir deste ponto, mas não se teve sucesso. Devido à carga do complexo, não foi possível a sua purificação por CCF de fase normal, independentemente do uso de solventes polares como acetonitrilo e metanol. A purificação por CCF de fase reversa também se revelou infrutífera, sobretudo pelo facto do ligando livre e do complexo apresentarem factores de retenção semelhantes.

Face às dificuldades encontradas e ao custo dos complexos de ródio, decidiu-se que era mais vantajoso determinar primeiro se os complexos sintetizados apresentam ou não actividade biológica antes de se investir mais tempo e recursos na sua purificação. Os contaminantes presentes no crude (betaína livre, fosfatos e trifluoroacetato) não deverão ser prejudiciais para as linhas celulares, e eventuais efeitos biológicos podem ser facilmente detectados por ensaios controlo. Nesse sentido, sintetizaram-se novamente os complexos com betaínas, sendo de seguida encaminhados para os ensaios biológicos sem qualquer passo adicional de purificação. Apenas se procurou garantir uma troca eficiente, através do aumento do tempo de reacção para 24 horas e do uso de um ligeiro excesso de ligando. Garantiu-se também que não existia precursor **54** na mistura (por CCF e/ou ^{19}F RMN).

Infelizmente, os ensaios biológicos em linhas celulares CaCo-2, MCF-7 e NCI-H460 não foram concluídos a tempo da apresentação desta tese.

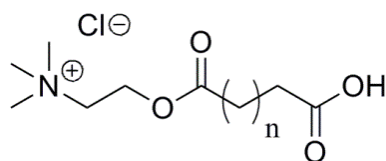
2.2.3 Estudos de estabilidade enzimática de ésteres de colina

Apesar de não pertencerem à família das betaínas, os monoésteres de colina de ácidos dicarboxílicos (Esquema 2.7) são, em termos de estrutura, muito semelhantes a

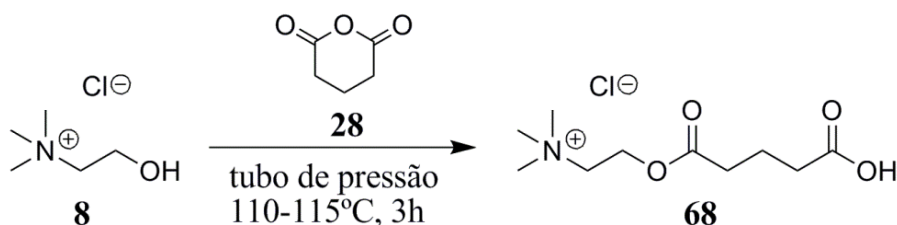
esta família. Pode até afirmar-se que são versões mais biodegradáveis, tendo em conta que a função éster pode ser facilmente biodegradada, e os produtos daí resultantes, colina e ácido dicarboxílico, são extremamente biocompatíveis.

Sendo a colina uma molécula com carga e essencial na dieta dos seres humanos, a sua absorção e internalização celular é efectuada através de transportadores próprios.^{47, 114} Estes transportadores podem, por isso, ser aproveitados para a internalização de moléculas conjugadas com colina. Não existe, contudo, selectividade em virtude da presença dos ditos transportadores na generalidade dos tecidos. A não ser no caso de tecidos cancerígenos. Devido ao seu desenvolvimento acelerado, as suas necessidades metabólicas são consideravelmente superiores aos tecidos saudáveis, particularmente no que diz respeito aos fosfolípidos membranares, sendo a fosfatidilcolina o mais comum. Isto traduz-se não só numa maior absorção de colina como na presença de um número anormal de transportadores nas membranas celulares tumorais. Com base neste conceito, Uppal *et al* descreveram um radiofármaco (com ⁶⁷Gálio(III)) derivado de colina, com elevada acumulação em tecidos tumorais porém reduzida nas células saudáveis.¹¹⁵

O uso de monoésteres de colina de ácidos dicarboxílicos como ligandos em complexos de dirródio(II) poderá, por isso, ser útil para lhes conferir alguma selectividade. É necessário, no entanto, verificar primeiro a estabilidade enzimática da função éster, tendo em conta a presença de esterases e proteases no sistema sanguíneo.



Esquema 2.7 – Estrutura geral de monoésteres de colina de ácidos dicarboxílicos.



Esquema 2.8 – Metodologia usada para a síntese de cloreto de hidrogenoglutarilcolina (**68**).

Nesse sentido, sintetizou-se o composto hidrogenoglutarilcolina (**68**). Trata-se de um composto que pode ser sintetizado muito facilmente e com bons rendimentos a partir de cloreto de colina e anidrido glutárico (Esquema 2.8). A síntese a partir de diácidos mais longos é bem mais complicada em comparação com o uso de anidridos, como já foi mencionado anteriormente (ver secção 1.2.1.3). De seguida estudou-se a estabilidade do composto **68** em soluções aquosas a 37°C com vários tipos de enzimas, nomeadamente lipases (CALA e lipase R AMANO) esterases (esterase de fígado de porco), proteases (papaína) e uma espécie híbrida com dupla actividade, lipase e protease (Newlase F). Incubaram-se as amostras durante cerca de sete dias e controlou-se o decorrer da reacção de hidrólise por ^1H RMN (ver Anexos). As percentagens de éster registadas no final dos ensaios encontram-se compiladas na Tabela 1. Os resultados obtidos demonstram que quase todas as enzimas utilizadas não conseguem fomentar a reacção de hidrólise do monoéster de colina. Tal não é totalmente inesperado, pois é conhecida a aversão da maioria das enzimas a moléculas com grupos carregados, em virtude da presença de resíduos com cargas no seu sítio activo (Esquema 1.9). Apenas o ensaio com Newlase F apresenta uma percentagem de hidrólise superior ao ensaio controlo. Como se trata de uma enzima com capacidade catalítica dupla, lipase e protease, o seu sítio activo deverá ser mais lábil e, por isso, consegue acomodar substrato iónico. De qualquer forma, a percentagem de hidrólise obtida não é significativa tendo em conta o enorme intervalo de tempo associado.

Tabela 1 – Resultados da hidrólise enzimática do composto **68** após 163 ± 6 horas (≈ 7 dias) de incubação a 37°C.^a

Enzima	% Ester
-	96.1
CALA	97.6
Lipase R AMANO	97.9
Esterase de fígado de porco	97.6
Papaína	97.1
Newlase F	93.7

^a Uma solução de **68** (0.020 g) com a enzima especificada (0.020 g) em D₂O (0.5 mL) foi incubada a 37°C num tubo de RMN com agitação. A percentagem de éster foi determinada por ^1H RMN.

2.3

CONCLUSÕES

Sintetizaram-se quatro betaínas, isto é, sais de amónio trimetilalquílicos com um ácido carboxílico terminal na cadeia longa, com rendimentos bons a moderados. Procedeu-se à preparação de complexos de dirródio(II) baseados nestes compostos, a partir de troca ligandos em precursores activados como $\text{cis-Rh}_2(\text{OAc})_2(\text{OCOCF}_3)_2$. A purificação dos complexos iónicos por CCF de fase normal ou de fase reversa revelou-se infrutífera, pelo que se decidiu estudar a actividade biológica da mistura antes de se investir mais tempo e recursos na sua purificação.

Após a síntese de novos complexos, estes foram encaminhados, sem nenhum passo adicional de purificação, para ensaios de actividade biológica contra diferentes linhas celulares tumorais (CaCo-2, MCF-7 e NCI-H460). Infelizmente os estudos biológicos não foram concluídos a tempo da apresentação desta tese. Caso sejam promissores, proceder-se-á à síntese de complexos com ligandos iónicos do mesmo género mas com catiões diferentes, por exemplo piridínio ou quinolínio. Estes grupos têm particular interesse pois, devido à sua aromaticidade, poderão actuar como agentes de intercalação no DNA, contribuindo para o desenvolvimento de complexos de ródio com vários mecanismos de acção. Além da sua actividade biológica, e tendo em conta o trabalho desenvolvido anterior neste grupo,⁸⁹ também será investigada a sua actividade catalítica em reacções modelo de inserção C-H e de cicloadição.

Estudou-se também a estabilidade enzimática do cloreto de hidrogenoglutarilcolina em soluções aquosas a 37°C. Das várias enzimas estudadas, apenas o ensaio com Newlase F apresentou uma percentagem de hidrólise superior ao ensaio controlo. Todavia, o resultado obtido é insignificante tendo em conta o enorme intervalo de tempo necessário (cerca de sete dias para menos de 7% de hidrólise). Este género de compostos poderá ser útil para conferir alguma selectividade aos complexos de dirródio(II).

CAPÍTULO III

SECÇÃO EXPERIMENTAL

3.1

MÉTODOS GERAIS

Todos os reagentes foram adquiridos comercialmente (pureza >95%), exceptuando nos casos indicados. Todos os solventes foram adquiridos comercialmente, exceptuando nos casos indicados, e purificados apropriadamente quando necessário.

A enzima Lipase B de *Candida antarctica* (Novozym® 435) foi gentilmente oferecida pela Novo Nordisk Bioindustrial (Espanha). As enzimas Newlase F e Lipase R Amano foram gentilmente cedidas pela Amano Enzyme Inc (Japão). As enzimas Lipase A de *Candida antarctica* (em solução), Esterase de fígado de porco e Papaína foram adquiridas à Sigma-Aldrich (Alemanha).

Todo o material de vidro foi previamente seco em estufa a 120°C. Em transformações anidras, o material de vidro foi igualmente seco à chama sob atmosfera inerte. Todas as soluções aquosas foram preparadas usando água destilada.

3.1.1 Detecção, isolamento e purificação dos produtos reaccionais

As misturas reaccionais foram analisadas por cromatografia de camada fina (CCF) usando placas de sílica gel 60 ALUGRAM® Xtra SIL G/UV₂₅₄, Macherey-Nagel (Alemanha). Quando necessário, a visualização das manchas na CCF foi efectuada através de irradiação UV e/ou por imersão da placa numa solução etanólica de ácido fosfomolibdénico, seguido de aquecimento.

Os complexos de dirródio(II) foram igualmente analisados por comatografia de camada fina de fase reversa (CCF-FR) através de placas RP-8 F₂₅₄S, Merck (Alemanha).

Na purificação/isolamento de produtos reacionais por cromatografia em coluna foi utilizada sílica gel 60 (tamanho de partícula 0.015-0.040 mm), Merck (Alemanha). O sistema de eluentes encontra-se discriminado no respectivo procedimento experimental.

3.1.2 Caracterização

A estrutura de todos os compostos sintetizados foi confirmada por Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Os espectros de protão (^1H 300 MHz), de carbono (^{13}C 75 MHz) e de flúor (^{19}F 282 MHz) foram adquiridos à temperatura ambiente num espectrómetro Bruker Avance II+ 300 MHz, tendo-se usado como referência o pico correspondente ao solvente residual. Os desvios químicos encontram-se expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento em hertz (Hz).

O teor em água dos líquidos iónicos sintetizados foi determinado por um método de titulação Karl-Fisher, usando um coulómetro Methrom 831 KF.

As medições por calorimetria diferencial de varrimento (DSC) foram realizadas no Departamento de Engenharia de Química do Instituto Superior Técnico, utilizando um calorímetro 2920 MDSC, TA Instruments Inc (E.U.A.), a velocidades de varrimento de 6 ou 8°C/min.

Os espectros de massa de baixa resolução foram efectuados pelo serviço de Espectrometria de Massa da Faculdade de Farmácia, através de um espectrómetro Micromass® Quatro Micro triple quadrupole, Waters® (Irlanda), com uma fonte de ionização por electrospray.

3.1.3 Análise por cromatografia gasosa

A análise por cromatografia gasosa foi efectuada num cromatógrafo GC-2010 plus, Shimadzu (Japão), com um detector de ionização por chama e utilizando uma coluna capilar quiral CP-Chirasil-DexCB (25mx0.25mmx0.25 μm); He como gás transportador; injector e detector a 250°C; velocidade linear 28.1 cm/s; fluxo da coluna 0.92 mL/min; rácio do split:100; programa do forno: 20 min a 120°C, rampa de 15°C/min até 180°C, 5 min a 180°C; dodecano: t_r = 6.28 min, 1-feniletanol: t_r (R) = 10.15 min, t_r (S) = 10.95 min.

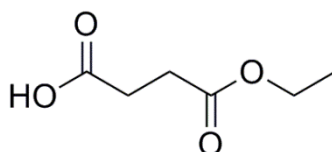
3.2

PREPARAÇÃO DOS LÍQUIDOS IÔNICOS

3.2.1 Procedimento geral para a síntese dos ésteres monoetílicos a partir de anidridos

Uma solução etanólica (10 mmol) de anidrido (5 mmol) com 4-(dimetilamino)piridina (0.25 mmol) e trietilamina (6 mmol) foi deixada sob agitação vigorosa à temperatura ambiente durante 24 horas. Após acidificar com ácido clorídrico (2M, 15 mL) extraiu-se a solução com éter dietílico (4x10 mL). De seguida juntaram-se as fases etéreas, secou-se com sulfato de sódio anidro, filtrou-se o precipitado e evaporou-se o solvente das águas-mãe a pressão reduzida.

3.2.1.1 Hidrogenossuccinato de etilo (**29**)



Partindo de anidrido succínico (0.565 g), 4-(dimetilamino)piridina (0.033 g), trietilamina (0.850 mL) e etanol absoluto (0.600 mL), o composto **29** foi obtido sob a forma de um líquido incolor (0.748 g, 91.4%).

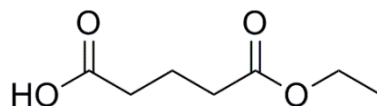
R_f: 0.35 (hexano/acetato de etilo (3:1)).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 4.13 (q, J = 7.14 Hz, 2H), 2.63 (m, 4H), 1.24 ppm (t, J = 7.12 Hz, 3H).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 178.3, 172.4, 61.0, 29.1, 29.0, 14.2 ppm.

Os dados estruturais encontram-se de acordo com o descrito na literatura.⁷⁷

3.2.1.2 Hidrogenoglutarato de etilo (**30**)



Partindo de anidrido glutárico (0.576 g), 4-(dimetilamino)piridina (0.033 g), trietilamina (0.830 mL) e etanol absoluto (0.590 mL), o composto **30** foi obtido sob a forma de um líquido incolor (0.493 g, 62%).

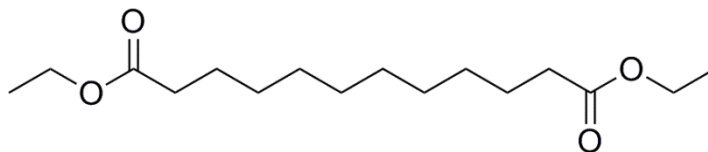
R_f: 0.45 (hexano/acetato de etilo (3:1)).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 4.12 (q, J = 7.12 Hz, 2H), 2.40 (m, 4H), 1.94 (m, 2H), 1.24 ppm (t, J = 7.11 Hz, 3H).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 179.2, 173.1, 60.6, 33.3, 33.1, 19.9, 14.3 ppm.

Os dados estruturais encontram-se de acordo com o descrito na literatura.¹¹⁶

3.2.2 Síntese de dodecanodioato dietílico (**40**)



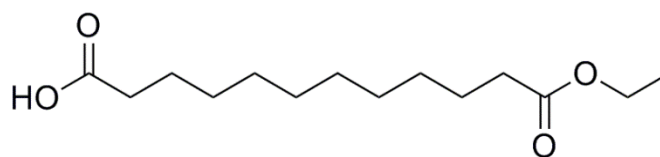
Uma solução etanólica (35 mL) de ácido dodecanodióico (2.340 g, 10.2 mmol) com 10-12 gotas de ácido sulfúrico foi aquecida sob refluxo durante 6 horas. Deixou-se sob agitação à temperatura ambiente durante a noite. Concentrou-se a mistura reaccional a pressão reduzida e dissolveu-se em éter dietílico (25 mL). Extraíu-se a fase etérea com solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio (2x10 mL), secou-se com sulfato de sódio anidro, filtrou-se o precipitado e evaporou-se o solvente das águas-mãe a pressão reduzida. Obteve-se o composto **40** sob a forma de um líquido incolor (2.790 g, 95.5%)

R_f: 0.75 (hexano/acetato de etilo (6:1)).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 4.11 (q, J = 7.14 Hz, 4H), 2.27 (t, J = 7.53 Hz, 4H), 1.60 (m, 4H), 1.26 ppm (m, 18H).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 174.0, 60.3, 34.5, 29.5, 29.3, 29.2, 25.1, 14.4 ppm.

3.2.3 Síntese de hidrogenododecanodioato de etilo (**39**)



Método A

Uma suspensão de ácido dodecanodióico (0.700 g, 3.0 mmol) e resina DOWEX AG 50W-X2 (200-400 mesh, 3 g) em octano/acetato de etilo (4:1, 30 mL) foi aquecida a 80°C sob refluxo durante 10 horas. Filtrou-se a resina antes de se extrair a mistura reaccional com solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio (3x10 mL). Após acidificar a fase aquosa com HCl (2M, 20 mL) esta foi extraída com acetato de etilo (4x15 mL). Juntaram-se as fases orgânicas, secou-se com sulfato de sódio anidro, filtrou-se o precipitado e evaporou-se o solvente das águas-mãe a pressão reduzida. Quando se observou contaminação com diácido, purificou-se o produto por cromatografia em coluna (eluente: hexano/acetato de etilo (6:1) para (5:1)). Obteve-se o composto **39** sob a forma de um sólido branco (0.383 g, 49.4%)

Método B

Uma solução de ácido dodecanodióico (0.481 g, 2.1 mmol), dodecanodioato dietílico (1.212 g, 4.2 mmol), etanol absoluto (0.310 mL, 5.3 mmol) e 4-5 gotas de ácido sulfúrico (96% p/p) em tetra-hidrofurano (2.1 mL) foi aquecida a 75°C num tubo de pressão (15 mL) durante 22 horas. Diluiu-se a mistura reaccional em ciclo-hexano (10 mL) e removeu-se a fase aquosa que imediatamente se forma. Extraiu-se a fase orgânica com solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio (4x5 mL). A evaporação a pressão reduzida do solvente da fase de ciclo-hexano permitiu a recuperação de dodecanodioato dietílico (1.024 g). Juntaram-se as fases aquosas, acidificou-se com HCl (2M, 15 mL) e extraiu-se com acetato de etilo (4x15 mL). Juntaram-se as fases orgânicas, secou-se com sulfato de sódio anidro, filtrou-se o precipitado e evaporou-se o solvente das águas-mãe a pressão reduzida. Quando se observou contaminação com diácido, purificou-se o produto por cromatografia em coluna (eluente: hexano/acetato de etilo (6:1) para (5:1)). Obteve-se o composto **39** sob a forma de um sólido branco (0.349 g, 64.3%).

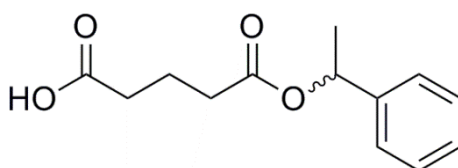
R_f: 0.45 (hexano/acetato de etilo (6:1)).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 4.12 (q, J = 7.13 Hz, 2H), 2.34 (t, J = 7.48 Hz, 2H), 2.28 (t, J = 7.53 Hz, 2H), 1.61 (m, 4H), 1.27 ppm (m, 15H).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 179.7, 174.1, 60.3, 34.5, 34.1, 29.47, 29.34, 29.32, 29.25, 29.16, 25.1, 24.8, 14.4 ppm.

Os dados estruturais encontram-se de acordo com o descrito na literatura.⁸¹

3.2.4 Síntese de hidrogenoglutarato de (±)-1-feniletilo (**42**)



Uma solução de (±)-1-feniletanol (0.600 mL, 5.0 mmol), anidrido glutárico (0.695 g, 6.1 mmol), 4-(dimetilamino)piridina (0.063 g, 0.5 mmol) e trietilamina (0.830 mL, 6mmol) em acetonitrilo (10 mL) foi deixada sob agitação à temperatura ambiente durante 24 horas. Diluiu-se a solução com HCl (2M, 30 mL) e extraiu-se com éter dietílico (4x12 mL). Juntaram-se as fases orgânicas, secou-se com sulfato de sódio anidro, filtrou-se o precipitado e concentrou-se o produto a pressão reduzida. Após purificação por cromatografia em coluna (eluente: hexano/acetato de etilo (4:1) para (3:1)) obteve-se o composto **42** sob a forma de um líquido incolor (1.152 g, 67.9%)

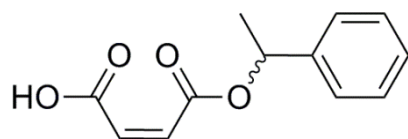
R_f: 0.40 (hexano/acetato de etilo (3:1)).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.31 (m, 5H), 5.89 (q, J = 6.60 Hz, 1H), 2.42 (m, 4H), 1.95 (m, 2H), 1.53 ppm (d, J = 6.60 Hz, 3H).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 179.3, 173.1, 141.6, 128.6, 128.0, 126.1, 72.6, 33.3, 33.1, 22.3, 19.9 ppm.

Os dados estruturais encontram-se de acordo com o descrito na literatura.¹¹⁷

3.2.5 Síntese de hidrogenomaleato de (±)-1-feniletilo (45)



Uma solução de anidrido maleico (0.588 g, 6.0 mmol) e (±)-1-feniletanol (0.485 mL, 4.0 mmol) em tolueno (5 mL) foi aquecida a 100-105°C num tubo de pressão (15 mL) durante a noite. Adicionou-se HCl (2M, 15 mL) e extraiu-se com éter dietílico (3x10 mL). Juntaram-se as fases orgânicas, secou-se com sulfato de sódio anidro, filtrou-se o precipitado e concentrou-se o crude a pressão reduzida. Após purificação por cromatografia em coluna (eluente: hexano/éter dietílico (3:2) para (1:1)) obteve-se o composto **45** sob a forma de um líquido incolor (0.404 g, 91.7%).

R_f: 0.31 (hexano/éter dietílico (3:2)).

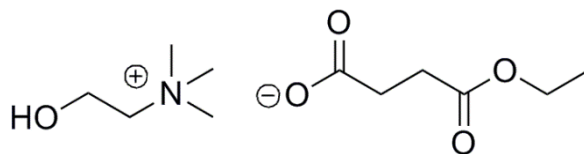
¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.37 (m, 5H), 6.40 (m, 2H), 6.01 (q, J = 6.59 Hz, 1H), 1.64 ppm (d, J = 6.63 Hz, 3H).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 166.8, 165.4, 139.9, 135.6, 130.0, 128.8, 128.7, 126.5, 75.7, 21.8 ppm.

3.2.6 Procedimento geral para a síntese dos líquidos iônicos

Carregou-se uma coluna de AMBERLITE IRA-400(OH) (2.0 g por 1 mmol de cloreto de colina) com uma solução metanólica de cloreto de colina (1 eq, 0.1M). Recolheu-se gota-a-gota para um Erlenmeyer, sob banho de gelo, com uma solução do monoéster (1 eq) em acetonitrilo (metanol para o hidrogenoadipato de metilo) até o eluído apresentar pH neutro. Adicionou-se uma pequena quantidade de carvão activado e deixou-se sob agitação durante a noite. Filtrou-se o precipitado e evaporou-se o solvente das águas-mãe a pressão reduzida. Secou-se ao vácuo à temperatura ambiente durante pelo menos 48 horas (pelo menos 72 horas no caso do dodecanodioato de etilo e colina).

3.2.6.1 Succinato de etilo e colina (**33**)



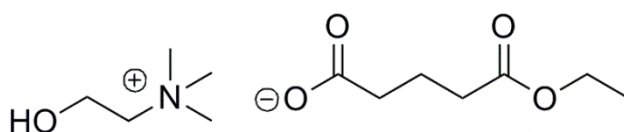
Partindo de hidrogenossuccinato de etilo (0.456 g, 3.12 mmol) e de cloreto de colina (0.437 g, 3.13 mmol), obteve-se o composto **33** na forma de um líquido viscoso, translúcido e amarelo pálido (0.738 g, 94.9%).

¹H RMN (300 MHz, D₂O): δ = 4.12 (q, J = Hz, 2H), 4.02 (m, 2H), 3.48 (m, 2H), 3.17 (s, 9H), 2.55 (t, 2H), 2.44 (t, 2H), 1.21 ppm (t, J = 7.14 Hz, 3H).

¹³C RMN (75 MHz, D₂O): δ = 180.7, 176.0, 67.3, 61.6, 55.5, 53.8, 31.7, 30.5, 13.3 ppm.

Teor de H₂O (% p/p): 0.9

3.2.6.2 Glutarato de etilo e colina (**34**)



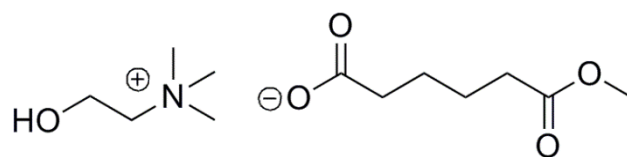
Partindo de hidrogenoglutarato de etilo (0.495 g, 3.10 mmol) e de cloreto de colina (0.426 g, 3.05 mmol), obteve-se o composto **34** na forma de um líquido viscoso, translúcido e amarelo pálido (0.733 g, 91.5%).

¹H RMN (300 MHz, D₂O): δ = 4.15 (q, J = 7.14 Hz, 2H), 4.05 (m, 2H), 3.51 (m, 2H), 3.19 (s, 9H), 2.39 (t, J = 7.47 Hz, 2H), 2.21 (t, J = 7.46 Hz, 2H), 1.84 (m, J = 7.46 Hz, 2H), 1.24 ppm (t, J = 7.16 Hz, 3H).

¹³C RMN (75 MHz, D₂O): δ = 182.1, 176.5, 67.4, 61.6, 55.5, 53.8, 36.3, 33.6, 21.1, 13.3 ppm.

Teor de H₂O (% p/p): 1.5

3.2.6.3 Adipato de metilo e colina (**35**)



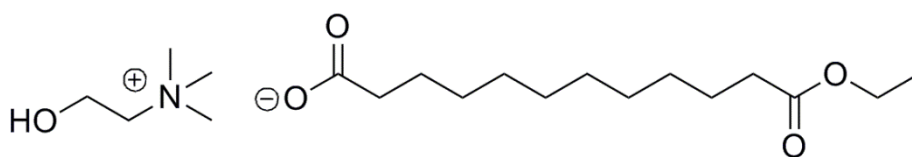
Partindo de hidrogenoadipato de metilo (0.450 mL, 3.03 mmol) e de cloreto de colina (0.414 g, 2.97 mmol), obteve-se o composto **35** na forma de um líquido viscoso, translúcido e amarelo pálido (0.678 g, 86.7%).

¹H RMN (300 MHz, D₂O): δ = 4.05 (m, 2H), 3.68 (s, 3H), 3.50 (m, 2H), 3.18 (s, 9H), 2.40 (t, J = 7.00 Hz, 2H), 2.20 (t, J = 6.96 Hz, 2H), 1.57 ppm (m, 4H).

¹³C RMN (75 MHz, D₂O): δ = 183.3, 177.4, 67.4, 55.5, 53.8, 52.0, 37.1, 33.4, 25.3, 24.1 ppm.

Teor de H₂O (% p/p): 1.6

3.2.6.4 Dodecanodioato de etilo e colina (**41**)



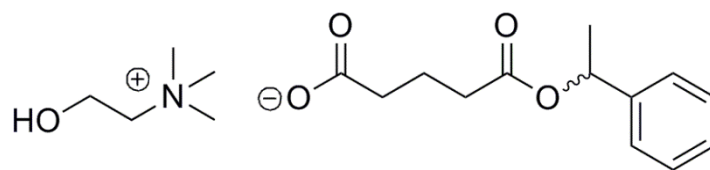
Partindo de hidrogenododecanodioato de etilo (0.514 g, 1.99 mmol) e de cloreto de colina (0.270 g, 1.93 mmol), obteve-se o composto **41** na forma de um sólido muito higroscópico amarelo pálido (0.587 g, 84.1%)

¹H RMN (300 MHz, D₂O): δ = 4.11 (q, J = 7.12 Hz, 2H), 4.03 (m, 2H), 3.50 (m, 2H), 3.18 (s, 9H), 2.32 (t, J = 7.38 Hz, 2H), 2.14 (t, J = 7.58 Hz, 2H), 1.54 (m, 4H), 1.23 ppm (m, 15H).

¹³C RMN (75 MHz, D₂O): δ = 183.5, 176.3, 67.4, 61.3, 55.5, 53.8, 37.7, 29.1, 28.99, 28.91, 28.89, 28.7, 28.5, 26.0, 24.6, 13.5 ppm.

Teor de H₂O (% p/p): 2.0

3.2.6.5 Glutarato de (±)1-feniletilo e colina (**43**)

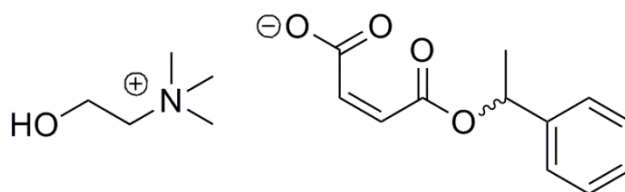


Partindo de hidrogenoglutarato de (±)1-feniletilo (0.448 g, 1.9 mmol) e de cloreto de colina (0.260 g, 1.9 mmol), obteve-se o composto **43** na forma de um líquido viscoso, translúcido e amarelo pálido (0.541 g, 83.9%)

¹H RMN (300 MHz, D₂O): δ = 7.37 (m, 5H), 5.80 (q, J = 6.63 Hz, 1H), 4.02 (m, 2H), 3.47 (m, 2H), 3.15 (s, 9H), 2.39 (t, J = 7.47 Hz, 2H), 2.16 (t, J = 7.52 Hz, 2H), 1.80 (m, J = 7.48 Hz, 2H), 1.52 ppm (d, J = 6.63 Hz, 3H).

¹³C RMN (75 MHz, D₂O): δ = 182.1, 175.6, 141.6, 128.8, 128.2, 125.9, 73.8, 67.4, 55.5, 53.8, 36.3, 33.8, 21.3, 21.1 ppm.

3.2.6.6 Maleato de (±)1-feniletilo e colina (**46**)



Partindo de hidrogenomaleato de (±)1-feniletilo (0.366 g, 1.66 mmol) e de cloreto de colina (0.231 g, 1.65 mmol), obteve-se o composto **46** na forma de um líquido muito viscoso, translúcido e amarelo pálido (0.504 g, 94.5%)

¹H RMN (300 MHz, D₂O): δ = 7.41 (m, 5H), 6.41 (d, J = 9.12 Hz, 1H), 5.85 (m J = 4.95 Hz, 1H), 5.83 (d, J = 9.12 Hz, 1H), 4.03 (m, 2H), 3.48 (m, 2H), 3.17 (s, 9H), 1.50 ppm (dd, J = 4.95 Hz, 3H).

¹³C RMN (75 MHz, D₂O): δ = 174.3, 166.6, 141.6, 141.3, 128.7, 128.1, 125.9, 118.6, 74.2, 67.4, 55.5, 53.8, 21.4 ppm.

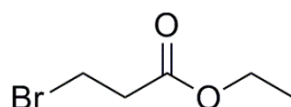
3.3

PREPARAÇÃO DOS COMPLEXOS DE DIRRÓDIO(II)

3.3.1 Procedimento geral para a síntese de ω -bromoalcanoatos de etilo

Uma solução etanólica do respectivo ácido carboxílico (3.0-10.2 mmol, 0.54M) e 5-6 gotas de ácido sulfúrico (96% p/p) foi aquecida sob refluxo durante 6 horas. Deixou-se sob agitação à temperatura ambiente durante a noite. Concentrou-se o crude a pressão reduzida e dissolveu-se em éter dietílico (15 mL). Extraíu-se a fase etérea com solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio (2x10 mL), secou-se com sulfato de sódio anidro, filtrou-se o precipitado e evaporou-se o solvente das águas-mãe a pressão reduzida.

3.3.1.1 3-Bromopropanoato de etilo (**60**)

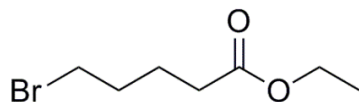


Partindo de ácido 3-bromopropanóico (1.553 g, 10.2 mmol) e etanol absoluto (18.5 mL), obteve-se o composto **60** sob a forma de um líquido incolor (1.357 g, 73.5%)

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ = 4.17 (q, J = 7.14 Hz, 2H), 3.57 (t, J = 6.86 Hz, 2H), 2.89 (t, J = 6.84 Hz, 2H), 1.26 ppm (t, J = 7.14 Hz, 3H).

^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ = 170.6, 61.1, 37.9, 26.1, 14.3 ppm.

3.3.1.2 5-Bromopentanoato de etilo (**61**)



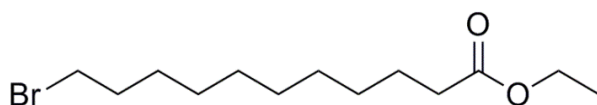
Partindo de ácido 5-bromopentanóico (1.850 g, 10.2 mmol) e etanol absoluto (18.5 mL), obteve-se o composto **61** sob a forma de um líquido amarelo pálido (1.973 g, 92.5%)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 4.12 (q, J = 7.14 Hz, 2H), 3.40 (t, J = 6.51 Hz, 2H), 2.32 (t, J = 7.18 Hz, 2H), 1.81 (m, 4H), 1.22 ppm (t, J = 7.14 Hz, 3H).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 173.3, 60.5, 33.4, 33.2, 32.1, 23.6, 14.4 ppm.

Os dados estruturais encontram-se de acordo com o descrito na literatura.¹¹⁸

3.3.1.3 11-Bromoundecanoato de etilo (**63**)



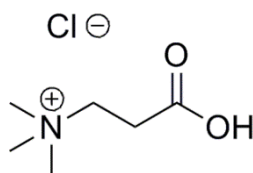
Partindo de ácido 11-bromoundecanóico (0.796 g, 3.0 mmol) e etanol absoluto (5.5 mL), obteve-se o composto **63** sob a forma de um sólido branco (0.810 g, 92.1%)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 4.11 (m, J = 7.13 Hz, 2H), 3.40 (t, J = 6.86 Hz, 2H), 2.28 (t, J = 7.52 Hz, 2H), 1.84 (m, J = 7.10 Hz, 2H), 1.59 (m, 2H), 1.27 ppm (m, 15H).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 174.0, 60.3, 34.5, 34.2, 33.0, 29.49, 29.45, 29.3, 29.2, 28.9, 28.3, 25.1, 14.4 ppm.

Os dados estruturais encontram-se de acordo com o descrito na literatura.⁷²

3.3.2 Síntese de cloreto de [2-(carboxi)etil]trimetilamônio (64)



Misturou-se uma solução aquosa de trimetilamina (6 mL, 3.8 mmol) e uma solução metanólica (6 mL) de 3-bromopropionato de etilo (0.559 g, 3.1 mmol) num tubo de pressão (35 mL), e aqueceu-se a 75-80°C durante 17 horas. Concentrou-se a solução a pressão reduzida, lavou-se com éter dietílico (2x5 mL), evaporou-se o restante solvente e dissolveu-se o crude em metanol (0.1M). Carregou-se uma coluna de AMBERLITE IRA-400(Cl) (2.0 g por 1 mmol de material de partida) com a solução metanólica e recolheu-se lentamente.. Evaporou-se o solvente a pressão reduzida, acidificou-se com HCl (10% p/p, 3 mL) e aqueceu-se sob refluxo durante 5-6 horas. Induziu-se a cristalização com adição de acetona e arrefecimento (4°C) durante a noite. Filtrou-se o precipitado e recristalizou-se em metanol/éter dietílico. Secou-se o produto ao vácuo durante pelo menos 24 horas. Obteve-se o composto **64** sob a forma de um pó branco (0.254 g, 48.8%).

¹H RMN (300 MHz, D₂O): δ = 3.63 (m, 2H), 3.12 (s, 9H), 2.88 ppm (m, 2H).

¹³C RMN (75 MHz, D₂O): δ = 174.1, 62.0, 52.9, 28.8 ppm.

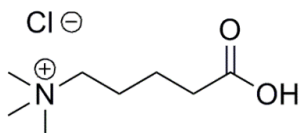
Os dados estruturais encontram-se de acordo com o descrito na literatura.¹¹⁹

3.3.3 Procedimento geral para a síntese das betaínas 65-67

Misturou-se uma solução aquosa de trimetilamina (1.2 eq, 0.6M) e uma solução metanólica do respectivo ω-bromoalcanoato de etilo (1.0 eq, 0.5M) num tubo de pressão (35 mL), e aqueceu-se a 75-80°C durante 17 horas. Concentrou-se a solução a pressão reduzida, lavou-se com éter dietílico (2x5 mL), evaporou-se o restante solvente e dissolveu-se o crude em metanol (0.1M). Carregou-se uma coluna de AMBERLITE IRA-400(OH) (2.0 g por 1 mmol de material de partida) com a solução metanólica e recolheu-se lentamente. Deixou-se o eluído sob agitação à temperatura ambiente durante a noite. Evaporou-se o solvente a pressão reduzida, acidificou-se com HCl (2M)

e induziu-se a cristalização com adição de tetra-hidrofurano e arrefecimento (4°C) durante a noite. Filtrou-se o precipitado e, quando necessário, recristalizou-se em metanol/éter dietílico. Secou-se o produto ao vácuo durante pelo menos 24 horas.

3.3.3.1 Cloreto de [4-(carboxi)butil]trimetilamónio (**65**)



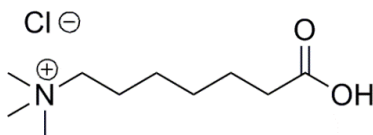
Partindo de solução aquosa de trietilamina (10 mL, 5.6 mmol) e de 5-bromopentanoato de etilo (0.983 g, 4.7 mmol), obteve-se o composto **65** sob a forma de um pó branco (0.498 g, 54.1%).

¹H RMN (300 MHz, D₂O): δ = 3.33 (m, 2H), 3.10 (s, 9H), 2.46 (t, 2H), 1.83 (m, 2H), 1.65 ppm (m, 2H).

¹³C RMN (75 MHz, D₂O): δ = 178.0, 66.1, 52.8, 32.9, 21.7, 20.9 ppm.

Os dados estruturais encontram-se de acordo com o descrito na literatura.¹¹⁹

3.3.3.2 Cloreto de [6-(carboxi)hexil]trimetilamónio (**66**)

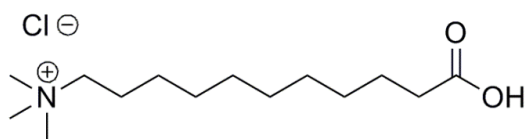


Partindo de solução aquosa de trietilamina (5 mL, 3.0 mmol) e de 7-bromoheptanoato de etilo (0.590 g, 2.5 mmol), obteve-se o composto **66** sob a forma de um pó branco (0.324 g, 57.9%).

¹H RMN (300 MHz, D₂O): δ = 3.44 (m, 2H), 3.24 (s, 9H), 2.54 (m, 2H), 1.93 (m, 2H), 1.77 (m, 2H), 1.54 ppm (m, 4H).

¹³C RMN (75 MHz, D₂O): δ = 179.1, 66.8, 52.9, 33.7, 27.7, 25.2, 24.0, 22.2 ppm.

3.3.3.3 Cloreto de [10-(carboxi)decil]trimetilamônio (**67**)

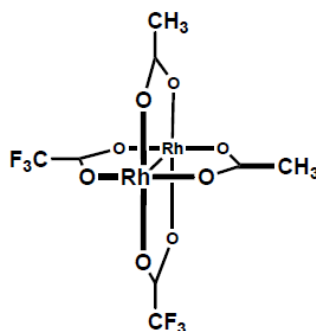


Partindo de solução aquosa de trietilamina (6 mL, 3.3 mmol) e de 11-bromoundecanoato de etilo (0.800, 2.7 mmol), obteve-se o composto **67** sob a forma de um pó branco (0.610 g, 80.7%).

¹H RMN (300 MHz, D₂O): δ = 3.30 (m, 2H), 3.10 (s, 9H), 2.38 (t, 2H), 1.78 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), 1.33 ppm (m, 12H).

¹³C RMN (75 MHz, D₂O): δ = 179.3, 66.8, 52.7, 33.9, 28.31, 28.27, 28.22, 28.13, 28.06, 25.4, 24.3, 22.2 ppm.

3.3.4 Síntese de cis-Rh₂(OAc)₂(OCOCF₃)₂ (**54**)



Num balão seco à chama e sob atmosfera inerte, uma suspensão de dirródio(II) tetra-acetato (0.0322 g, 0.073 mmol) em ácido trifluoroacético (4 mL) foi deixada sob agitação vigorosa durante 2 horas. Removeu-se o excesso de ácido sob vácuo e purificou-se o sólido obtido por CCF preparativa (eluente: tolueno/acetonitrilo 4:1). Secou-se o produto ao vácuo à temperatura ambiente durante a noite. Obteve-se o composto **54**, coordenado com duas moléculas de acetonitrilo, sob a forma de um sólido roxo (0.0335 g, 72.6%).

R_f: 0.51 (tolueno/acetonitrilo (1:4)).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 2.51 (s, 6H), 1.98 ppm (s, 6H).

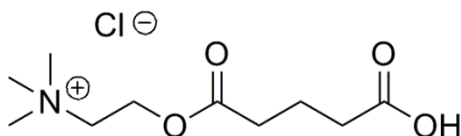
¹⁹F RMN (282 MHz, CDCl₃): δ = -74.37 ppm.

Os dados estruturais encontram-se de acordo com o descrito na literatura.¹⁰⁶

3.3.5 Procedimento geral para a síntese dos complexos iônicos de dirródio(II)

Uma suspensão de $\text{cis-Rh}_2(\text{OAc})_2(\text{OCOCF}_3)_2 \cdot 2\text{CH}_3\text{CN}$ (0.0032 g, 0.0051 mmol) e da respectiva betaína (0.0110-0.0125 mmol) em solução-tampão de fosfato (0.01M, pH 7.5, 1.0 mL), sob atmosfera inerte, foi aquecida a 45-50°C durante 24 horas. Evaporou-se o solvente a pressão reduzida. Os conjugados, obtidos na forma de misturas sólidas de cor verde, foram encaminhados para os ensaios de actividade biológica sem mais nenhum passo de purificação.

3.3.6 Síntese de cloreto de hidrogenoglutarilcolina (68)



Uma mistura de cloreto de colina (1.404 g, 10.1 mmol) e anidrido glutárico (5.710 g, 50 mmol) foi aquecida a 110-115°C num tubo de pressão (35 mL) durante 3 horas. Após arrefecer à temperatura ambiente a mistura reaccional foi lavada com acetona/éter dietílico (9:1, 2x100 mL) para remover o excesso de anidrido. Dissolveu-se o precipitado obtido em metanol e induziu-se a cristalização com adição de éter dietílico. Após arrefecer sob banho de gelo, filtrou-se o precipitado, lavou-se com éter dietílico e secou-se ao vácuo à temperatura ambiente durante a noite. Obteve-se o composto **68** sob a forma de um pó branco (2.214 g, 86.4%)

^1H RMN (300 MHz, D_2O): δ = 4.59 (m, 2H), 3.77 (m, 2H), 3.24 (s, 9H), 2.54 (t, J = 7.38 Hz, 2H), 2.47 (t, J = 7.28 Hz, 2H), 1.94 ppm (m, J = 7.30 Hz, 2H).

^{13}C RMN (75 MHz, D_2O): δ = 177.8, 174.6, 64.5, 58.3, 53.8, 32.8, 32.7, 19.4 ppm

Os dados estruturais encontram-se de acordo com o descrito na literatura.¹²⁰

3.4

ENSAIOS ENZIMÁTICOS

3.4.1 Procedimento geral para os ensaios de resolução cinética enzimática por transesterificação

Uma mistura de agente acilante iônico (2.1 mmol), (\pm)-1-feniletanol (0.100 mL, 0.83 mmol) e CALB (0.040 g) foi deixada sob agitação, entre 35 e 50°C, a pressão reduzida (100 mbar) durante 7 dias. A cada 24 horas retirou-se uma alíquota (\approx 0.050g). As amostras foram filtradas numa pequena coluna com sílica, lavando-se, de seguida, abundantemente com éter dietílico. Após evaporação a pressão reduzida, analisaram-se as amostras por cromatografia gasosa.

3.4.2 Procedimento geral para a reação modelo de resolução cinética enzimática por transesterificação de (\pm)-1-feniletanol

Uma mistura de (\pm)-1-feniletanol (0.050 mL, 0.41 mmol), acetato de vinilo (0.076 mL, 0.82 mmol) e CALB (0.020 g) em hexano (1 mL) foi deixada sob agitação a 35°C durante 16 horas. Retiraram-se alíquotas (0.100 mL) após 2, 4, 8 e 16 horas de reacção, As amostras foram filtradas numa pequena coluna com sílica, lavando-se, de seguida, abundantemente com éter dietílico. Após evaporação a pressão reduzida, analisaram-se as amostras por cromatografia gasosa.

3.4.3 Procedimento geral para os estudos de estabilidade de glutarato de etilo e colina (34)

Uma solução de glutarato de etilo e colina (0.020 g, 0.08 mmol) em D₂O (0.5 mL) com CALB (0.020 g), num tubo de RMN, foi deixada sob agitação a 37°C durante 270 minutos. Acompanhou-se o decorrer da reacção de hidrólise por ¹H RMN.

O estudo da hidrólise química foi efectuado nas mesmas condições mas sem adição de enzima. Acompanhou-se o decorrer da reacção durante cerca de 20 dias.

3.4.4 Procedimento geral para os ensaios de resolução cinética enzimática por hidrólise

Uma solução de líquido iónico (0.41 mmol) em água destilada (0.8 mL) com CALB (0.020 g) foi deixada sob agitação a 35°C durante 24 horas. Retiraram-se alíquotas (0.100 mL) após 1, 2, 4, 8 e 24 horas. As alíquotas foram extraídas com éter dietílico (4x1 mL), filtrando-se, de seguida, as fases orgânicas numa pequena coluna com sílica. Juntaram-se as fases orgânicas de cada amostra, secou-se com sulfato de sódio anidro, filtrou-se o precipitado e evaporou-se o solvente a pressão reduzida. Analisaram-se as mostras por cromatografia gasosa.

3.4.5 Procedimento geral para os estudos de estabilidade de cloreto de hidrogenoglutarilcolina (68)

Uma solução de cloreto de hidrogenoglutarilcolina (0.020 g, 0.08 mmol) em D₂O (0.5 mL) com uma das enzimas especificadas (0.020 g), num tubo de RMN, foi deixada sob agitação a 37°C durante cerca de 7 dias. As enzimas estudadas foram CALA, lipase R AMANO, esterase de fígado de porco, papaína e Newlase F. Acompanhou-se o decorrer da reacção de hidrólise por ¹H RMN.

O estudo da hidrólise química foi efectuado nas mesmas condições mas sem adição de enzima. Acompanhou-se o decorrer da reacção durante cerca de 14 dias.

BIBLIOGRAFIA

1. M. Juza, M. Mazzotti and M. Morbidelli, *Trends Biotechnol.*, 2000, **18**, 108-118.
2. R. A. Sheldon, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 1996, **67**, 1-14.
3. E. Fogassy, M. Nogradi, D. Kozma, G. Egri, E. Palovics and V. Kiss, *Org. Biomol. Chem.*, 2006, **4**, 3011-3030.
4. S. Wenda, S. Illner, A. Mell and U. Kragl, *Green Chem.*, 2011, **13**, 3007-3047.
5. M. Ahmed, T. Kelly and A. Ghanem, *Tetrahedron*, 2012, **68**, 6781-6802.
6. M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Kessler, R. Sturmer and T. Zelinski, *Angew. Chem.-Int. Edit.*, 2004, **43**, 788-824.
7. J. M. Finefield, D. H. Sherman, M. Kreitman and R. M. Williams, *Angew. Chem.-Int. Edit.*, 2012, **51**, 4802-4836.
8. M. Hohn and U. T. Bornscheuer, *ChemCatChem*, 2009, **1**, 42-51.
9. C. Najera and J. M. Sansano, *Chem. Rev.*, 2007, **107**, 4584-4671.
10. J. H. Schrittwieser, I. Lavandera, B. Seisser, B. Mautner, J. H. L. Spelberg and W. Kroutil, *Tetrahedron-Asymmetry*, 2009, **20**, 483-488.
11. B. Weiner, W. Szymanski, D. B. Janssen, A. J. Minnaard and B. L. Feringa, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 1656-1691.
12. K. Gopalaiah, *Chem. Rev.*, 2013, **113**, 3248-3296.
13. J. Aleman and S. Cabrera, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 774-793.
14. A. Ghanem and H. Y. Aboul-Enein, *Chirality*, 2005, **17**, 1-15.
15. R. Siedlecka, *Tetrahedron*, 2013, **69**, 6331-6363.
16. F. Faigl, E. Fogassy, M. Nogradi, E. Palovics and J. Schindler, *Tetrahedron-Asymmetry*, 2008, **19**, 519-536.
17. Y. Okamoto and T. Ikai, *Chem. Soc. Rev.*, 2008, **37**, 2593-2608.
18. M. Leeman, G. Brasile, E. Gelens, T. Vries, B. Kaptein and R. Kellogg, *Angew. Chem.-Int. Edit.*, 2008, **47**, 1287-1290.
19. O. Jurcek, M. Wimmerova and Z. Wimmer, *Coord. Chem. Rev.*, 2008, **252**, 767-781.
20. E. Vedejs and M. Jure, *Angew. Chem.-Int. Edit.*, 2005, **44**, 3974-4001.
21. D. Robinson and S. D. Bull, *Tetrahedron-Asymmetry*, 2003, **14**, 1407-1446.
22. H. Pellissier, *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2011, **353**, 1613-1666.
23. H. D. Dakin, *J. Physiol.-London*, 1903, **30**, 253-263.
24. J. C. Ruble, J. Tweddell and G. C. Fu, *J. Org. Chem.*, 1998, **63**, 2794-2795.
25. A. Kamal, M. A. Azhar, T. Krishnaji, M. S. Malik and S. Azeeza, *Coord. Chem. Rev.*, 2008, **252**, 569-592.
26. P. Hoyos, V. Pace and A. R. Alcantara, *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2012, **354**, 2585-2611.
27. O. Pamies and J. E. Backvall, *Chem. Rev.*, 2003, **103**, 3247-3261.
28. B. Schnell, K. Faber and W. Kroutil, *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2003, **345**, 653-666.
29. E. M. Anderson, M. Karin and O. Kirk, *Biocatal. Biotransform.*, 1998, **16**, 181-204.
30. C. Hedfors, K. Hult and M. Martinelle, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2010, **66**, 120-123.
31. S. Naik, A. Basu, R. Saikia, B. Madan, P. Paul, R. Chatterjee, J. Brask and A. Svendsen, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2010, **65**, 18-23.
32. C. Jose, R. D. Bonetto, L. A. Gambaro, M. D. G. Torres, M. L. Foresti, M. L. Ferreira and L. E. Briand, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2011, **71**, 95-107.
33. J. S. Wilkes, *Green Chem.*, 2002, **4**, 73-80.
34. P. D. de Maria and Z. Maugeri, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2011, **15**, 220-225.

35. Y. Fukaya, Y. Iizuka, K. Sekikawa and H. Ohno, *Green Chem.*, 2007, **9**, 1155-1157.
36. J. Gorke, F. Srienc and R. Kazlauskas, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 2010, **15**, 40-53.
37. C. J. Bradaric, A. Downard, C. Kennedy, A. J. Robertson and Y. H. Zhou, *Green Chem.*, 2003, **5**, 143-152.
38. M. Deetlefs and K. R. Seddon, *Green Chem.*, 2010, **12**, 17-30.
39. M. Petkovic, K. R. Seddon, L. P. N. Rebelo and C. S. Pereira, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 1383-1403.
40. R. F. M. Frade and C. A. M. Afonso, *Hum. Exp. Toxicol.*, 2010, **29**, 1038-1054.
41. M. Petkovic, J. L. Ferguson, H. Q. N. Gunaratne, R. Ferreira, M. C. Leitao, K. R. Seddon, L. P. N. Rebelo and C. S. Pereira, *Green Chem.*, 2010, **12**, 643-649.
42. S. K. Tang, G. A. Baker and H. Zhao, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 4030-4066.
43. M. Yoshizawa, M. Hirao, K. Ito-Akita and H. Ohno, *J. Mater. Chem.*, 2001, **11**, 1057-1062.
44. K. Bica, C. Rijksen, M. Nieuwenhuyzen and R. D. Rogers, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2010, **12**, 2011-2017.
45. R. Ferraz, L. C. Branco, C. Prudencio, J. P. Noronha and Z. Petrovski, *ChemMedChem*, 2011, **6**, 975-985.
46. C. Suresh, H. Zhao, A. Gumbs, C. S. Chetty and H. S. Bose, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012, **22**, 1734-1738.
47. J. K. Blusztajn, *Science*, 1998, **281**, 794-795.
48. H. Zhao, G. A. Baker and S. Holmes, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, **9**, 1908-1916.
49. G. J. Kortstee, *Archiv Fur Mikrobiologie*, 1970, **71**, 235-&.
50. S. H. Zeisel, in *Annual Review of Nutrition*, Annual Reviews, Palo Alto, 2006, vol. 26, pp. 229-250.
51. J. Pernak, A. Syguda, I. Mirska, A. Pernak, J. Nawrot, A. Pradzynska, S. T. Griffin and R. D. Rogers, *Chem.-Eur. J.*, 2007, **13**, 6817-6827.
52. B. Ahlstrom, M. Chelminskabertilsson, R. A. Thompson and L. Edebo, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1995, **39**, 50-55.
53. M. Kar, B. Winther-Jensen, M. Forsyth and D. R. MacFarlane, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, **15**, 7191-7197.
54. V. N. Klykov and G. A. Serebrennikova, *Russ. Chem. Bull.*, 1998, **47**, 1547-1549.
55. A. Rocha, T. Carvalho, P. Vidinha and N. M. T. Lourenco, *ChemPlusChem*, 2012, **77**, 1106-1111.
56. T. Kametani, K. Kigasawa, T. Hayasaka, M. Hiiragi, H. Ishimaru and S. Asagi, *J. Heterocycl. Chem.*, 1966, **3**, 129-&.
57. P. Nockemann, B. Thijs, K. Driesen, C. R. Janssen, K. Van Hecke, L. Van Meervelt, S. Kossmann, B. Kirchner and K. Binnemans, *J. Phys. Chem. B*, 2007, **111**, 5254-5263.
58. Y. H. Yu, X. M. Lu, Q. Zhou, K. Dong, H. W. Yao and S. J. Zhang, *Chem.-Eur. J.*, 2008, **14**, 11174-11182.
59. F. van Rantwijk and R. A. Sheldon, *Chem. Rev.*, 2007, **107**, 2757-2785.
60. H. Zhao, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2010, **85**, 891-907.
61. M. Naushad, Z. A. Alothman, A. B. Khan and M. Ali, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2012, **51**, 555-560.
62. M. Erbdinger, A. J. Mesiano and A. J. Russell, *Biotechnol. Prog.*, 2000, **16**, 1129-1131.

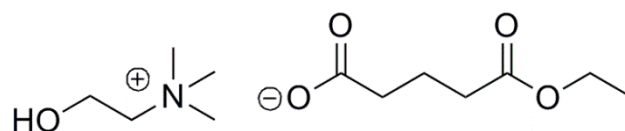
63. S. G. Cull, J. D. Holbrey, V. Vargas-Mora, K. R. Seddon and G. J. Lye, *Biotechnol. Bioeng.*, 2000, **69**, 227-233.
64. R. M. Lau, F. van Rantwijk, K. R. Seddon and R. A. Sheldon, *Org. Lett.*, 2000, **2**, 4189-4191.
65. A. Ghanem, *Tetrahedron*, 2007, **63**, 1721-1754.
66. S. Park and R. J. Kazlauskas, *J. Org. Chem.*, 2001, **66**, 8395-8401.
67. N. Wood, J. L. Ferguson, H. Q. N. Gunaratne, K. R. Seddon, R. Goodacre and G. M. Stephens, *Green Chem.*, 2011, **13**, 1843-1851.
68. Y. X. Fan and J. Q. Qian, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2010, **66**, 1-7.
69. W. Y. Lou, M. H. Zong and H. Wu, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2005, **41**, 151-156.
70. P. U. Naik, S. J. Nara, J. R. Harjani and M. M. Salunkhe, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2007, **44**, 93-98.
71. N. M. T. Lourenco and C. A. M. Afonso, *Angew. Chem.-Int. Edit.*, 2007, **46**, 8178-8181.
72. N. M. T. Lourenco, C. M. Monteiro and C. A. M. Afonso, *Eur. J. Org. Chem.*, 2010, 6938-6943.
73. S. Mishra, K. Karmodiya, P. Parasuraman, A. Surolia and N. Surolia, *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, **16**, 5536-5546.
74. G. Mingrone and M. Castagneto, *Nutr. Rev.*, 2006, **64**, 449-456.
75. R. Klein, D. Touraud and W. Kunz, *Green Chem.*, 2008, **10**, 433-435.
76. T. Nishiguchi, Y. Ishii and S. Fujisaki, *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 1*, 1999, 3023-3027.
77. J. Regourd, A. A. S. Ali and A. Thompson, *J. Med. Chem.*, 2007, **50**, 1528-1536.
78. M. Habulin and Z. Knez, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2009, **58**, 24-28.
79. N. Kataoka, M. Okudomi, N. Chihara and K. Matsumoto, *Lett. Org. Chem.*, 2012, **9**, 615-621.
80. V. I. Lodyato, I. L. Yurkova, V. L. Sorokin, O. I. Shadyro, V. I. Dolgopalets and M. A. Kisel, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004, **14**, 4253-4256.
81. X.-X. Zhang, C. A. H. Prata, J. A. Berlin, T. J. McIntosh, P. Barthelemy and M. W. Grinstaff, *Bioconjugate Chem.*, 2011, **22**, 690-699.
82. R. G. Jones, *J. Am. Chem. Soc.*, 1947, **69**, 2350-2354.
83. L. I. Zakharkin, V. V. Guseva and I. M. Churilova, *Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR Division of Chemical Science*, 1983, **32**, 419-421.
84. L. G. Bai, X. M. Li, J. Q. Zhu and B. A. H. Chen, *Energy Fuels*, 2011, **25**, 1811-1816.
85. D. E. Applequist, T. L. Renken and J. W. Wheeler, *J. Org. Chem.*, 1982, **47**, 4985-4995.
86. P. Mateus, R. Delgado, P. Brandao and V. Felix, *J. Org. Chem.*, 2012, **77**, 4611-4621.
87. O. I. Kropacheva, N. Z. Evtyukov, A. D. Yakovlev, A. L. Goldenberg and S. Y. Khaikin, *Russ. J. Appl. Chem.*, 1993, **66**, 894-897.
88. A. F. Trindade, J. A. S. Coelho, C. A. M. Afonso, L. F. Veiros and P. M. P. Gois, *ACS Catal.*, 2012, **2**, 370-383.
89. N. R. Candeias, C. Carias, L. F. R. Gomes, V. Andre, M. T. Duarte, P. M. P. Gois and C. A. M. Afonso, *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2012, **354**, 2921-2927.
90. N. R. Candeias, C. A. M. Afonso and P. M. P. Gois, *Org. Biomol. Chem.*, 2012, **10**, 3357-3378.

91. M. P. Doyle, R. Duffy, M. Ratnikov and L. Zhou, *Chem. Rev.*, 2010, **110**, 704-724.
92. G. Dequierez, V. Pons and P. Dauban, *Angew. Chem.-Int. Edit.*, 2012, **51**, 7384-7395.
93. M. Anada, T. Washio, N. Shimada, S. Kitagaki, M. Nakajima, M. Shiro and S. Hashimoto, *Angew. Chem.-Int. Edit.*, 2004, **43**, 2665-2668.
94. Y. Wang, J. Wolf, P. Zavalij and M. R. Doyle, *Angew. Chem.-Int. Edit.*, 2008, **47**, 1439-1442.
95. M. Heitbaum, F. Glorius and I. Escher, *Angew. Chem.-Int. Edit.*, 2006, **45**, 4732-4762.
96. D. C. Forbes, S. A. Patrawala and K. L. T. Tran, *Organometallics*, 2006, **25**, 2693-2695.
97. M. E. Moragues, J. Esteban, J. V. Ros-Lis, R. Martinez-Manez, M. D. Marcos, M. Martinez, J. Soto and F. Sancenon, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 15762-15772.
98. N. Katsaros and A. Anagnostopoulou, *Crit. Rev. Oncol./Hematol.*, 2002, **42**, 297-308.
99. R. F. M. Frade, N. R. Candeias, C. M. M. Duarte, V. Andre, M. T. Duarte, P. M. P. Gois and C. A. M. Afonso, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, **20**, 3413-3415.
100. M. J. Clarke, F. C. Zhu and D. R. Frasca, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2511-2533.
101. G. Sava, S. Zorzet, C. Turrin, F. Vita, M. Soranzo, G. Zabucchi, M. Cocchietto, A. Bergamo, S. DiGiovine, G. Pezzoni, L. Sartor and S. Garbisa, *Clin. Cancer Res.*, 2003, **9**, 1898-1905.
102. C. G. Hartinger, M. A. Jakupec, S. Zorbas-Seifried, M. Groessler, A. Egger, W. Berger, H. Zorbas, P. J. Dyson and B. K. Keppler, *Chem. Biodivers.*, 2008, **5**, 2140-2155.
103. A. Erck, L. Rainen, Whileyma.J, I. M. Chang, A. P. Kimball and J. Bear, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1974, **145**, 1278-1283.
104. F. M. Siu, I. W. S. Lin, K. Yan, C. N. Lok, K. H. Low, T. Y. C. Leung, T. L. Lam and C. M. Che, *Chem. Sci.*, 2012, **3**, 1785-1793.
105. F. A. Cotton, C. A. Murillo and R. A. Walton, *Multiple Bonds Between Metal Atoms*, 3rd edn., Springer, New York, 2005.
106. Y. Lou, T. P. Remarchuk and E. J. Corey, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 14223-14230.
107. A. N. Zaykov, B. V. Popp and Z. T. Ball, *Chem.-Eur. J.*, 2010, **16**, 6651-6659.
108. R. Koynova, B. Tenchov, L. Wang and R. C. MacDonald, *Mol. Pharm.*, 2009, **6**, 951-958.
109. F. Z. Kong, C. S. Zhou, J. Y. Wang, Z. Y. Yu and R. H. Wang, *ChemPlusChem*, 2013, **78**, 536-545.
110. Y. Chevalier and P. Leperchec, *J. Phys. Chem.*, 1990, **94**, 1768-1774.
111. Z. F. Fei, D. B. Zhao, T. J. Geldbach, R. Scopelliti and P. J. Dyson, *Chem.-Eur. J.*, 2004, **10**, 4886-4893.
112. K. Binnemans, *Chem. Rev.*, 2005, **105**, 4148-4204.
113. M. D. Barratt, *Toxicol. Vitro*, 1996, **10**, 85-94.
114. D. D. Allen and P. R. Lockman, *Life Sci.*, 2003, **73**, 1609-1615.
115. J. K. Uppal, P. P. Hazari, Raunak, K. Chuttani, M. Allard, N. K. Kaushik and A. K. Mishra, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, **9**, 1591-1599.
116. K. Kobayashi and Y. Kondo, *Org. Lett.*, 2009, **11**, 2035-2037.
117. M. Okudomi, K. Ageishi, T. Yamada, N. Chihara, T. Nakagawa, K. Mizuochi and K. Matsumoto, *Tetrahedron*, 2010, **66**, 8060-8067.

118. D. Poth, K. C. Wollenberg, M. Vences and S. Schulz, *Angew. Chem.-Int. Edit.*, 2012, **51**, 2187-2190.
119. G. Blunden, S. M. Gordon, T. A. Crabb, O. G. Roch, M. G. Rowan and B. Wood, *Magn. Reson. Chem.*, 1986, **24**, 965-971.
120. J. M. Lopes, A. B. Paninho, M. F. Molho, A. V. M. Nunes, A. Rocha, N. M. T. Lourenco and V. Najdanovic-Visak, *J. Chem. Thermodyn.*, 2013, **67**, 99-105.

ANEXOS

ESTUDOS DE ESTABILIDADE



Glutarato de etilo e colina (**34**)

Tabela I – Resultados da hidrólise química de **34**.^a

Tempo (h)	Tempo (dias)	% Ester	ln (% Ester)
0	0	100	4.605
0.9	0.04	99.8	4.603
2.9	0.12	99.8	4.603
6.9	0.29	99.3	4.598
29.2	1.2	99.3	4.598
119.2	5.0	99.2	4.597
288.9	12.0	98.3	4.588
476.4	19.9	95.6	4.560

^a Uma solução de **34** (0.020 g) em D₂O (0.5 mL) foi incubada a 37°C num tubo de RMN com agitação, adquirindo-se um espectro de próton (¹H RMN) após os tempos de incubação referidos.

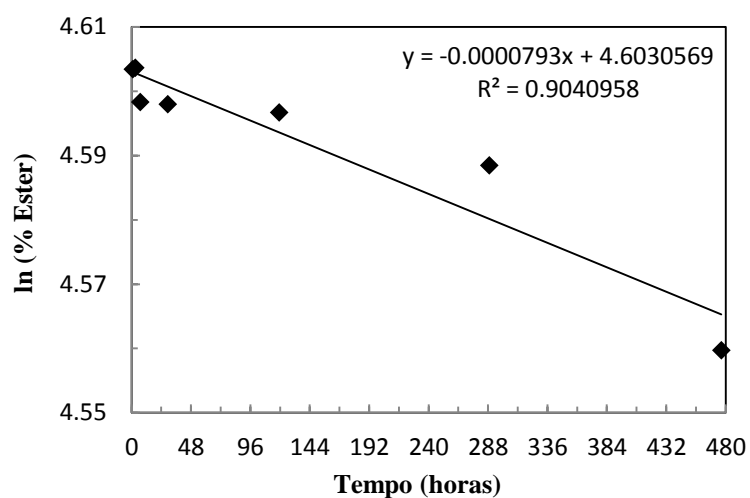


Figura I – Gráfico de ln (% Ester) em função do tempo para **34**.

Tabela II – Tempos de semi-vida ($t_{0.5}$) e de 5% de degradação ($t_{0.95}$) para **34**.^a

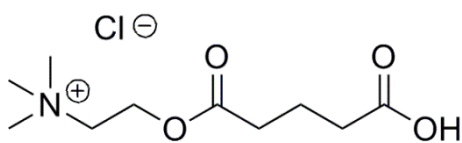
$k_{obs} = 0.0000793 \text{ h}^{-1}$		
	h^{-1}	dias^{-1}
$t_{0.5}$	630.5	26.3
$t_{0.95}$	8740.8	364.2

^a A constante de velocidade de pseudo-1^a ordem, k_{obs} , foi obtida a partir do declive do gráfico na Figura I.

Tabela III – Resultados da hidrólise enzimática de **34**.^a

Tempo (min)	Tempo (horas)	% Ester
0	0	100
10	0.17	77.2
20	0.33	54.6
30	0.50	47.0
65	1.08	15.1
145	2.42	4.1
270	4.50	1.6

^a Uma solução de **34** (0.020 g) com CALB (0.020 g) em D₂O (0.5 mL) foi incubada a 37°C num tubo de RMN com agitação, adquirindo-se um espectro de próton (¹H RMN) após os tempos de incubação referidos.



Cloroeto de hidrogenoglutarilcolina (**68**)

Tabela IV – Resultados da hidrólise química de **68**.^a

Tempo (h)	Tempo (dias)	% Ester	ln (% Ester)
0	0	100	4.605
0.25	0.01	99.98	4.605
0.5	0.02	99.99	4.605
0.75	0.03	99.98	4.605
1.0	0.04	99.96	4.605
22.5	0.94	99.26	4.598
42.5	1.8	98.50	4.590
115.5	4.8	97.36	4.578
157	6.5	96.06	4.565
280	11.7	93.33	4.536
327.5	13.6	91.84	4.520

^a Uma solução de **68** (0.020 g) em D₂O (0.5 mL) foi incubada a 37°C num tubo de RMN com agitação, adquirindo-se um espectro de próton (¹H RMN) após os tempos de incubação referidos.

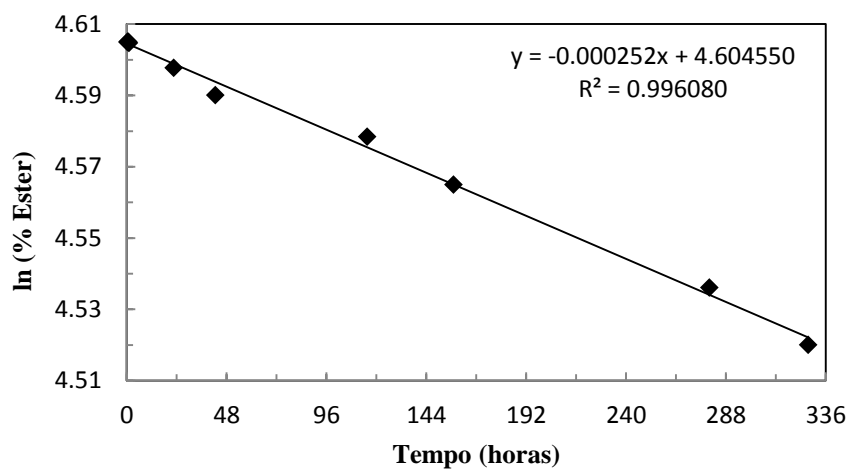


Figura II – Gráfico de ln (% Ester) em função do tempo para **68**.

Tabela V – Tempos de semi-vida ($t_{0.5}$) e de 5% de degradação ($t_{0.95}$) para **68**.^a

$k_{obs} = 0.000252 \text{ h}^{-1}$		
	h^{-1}	dias^{-1}
$t_{0.5}$	2750.6	114.6
$t_{0.95}$	198.4	8.3

^a A constante de velocidade de pseudo-1ª ordem, k_{obs} , foi obtida a partir do declive do gráfico na Figura II.

Tabela VI – Resultados da hidrólise, catalisada por CALA, de **68**.^a

Tempo (horas)	Tempo (dias)	% Ester
0	0	100
0.5	0.02	99.83
7.3	0.30	99.86
51.3	2.1	98.82
121.8	5.1	98.52
168.8	7.0	97.64

^a Uma solução de **68** (0.020 g) com CALA (0.020 g) em D₂O (0.5 mL) foi incubada a 37°C num tubo de RMN com agitação, adquirindo-se um espectro de próton (¹H RMN) após os tempos de incubação referidos.

Tabela VII – Resultados da hidrólise, catalisada por lipase R AMANO, de **68**.^a

Tempo (horas)	Tempo (dias)	% Ester
0	0	100
0.5	0.02	99.82
1.0	0.04	99.76
26.5	1.1	99.34
49.5	2.1	98.75
95.5	4.0	98.39
166.5	6.9	97.93

^a Uma solução de **68** (0.020 g) com lipase R AMANO (0.020 g) em D₂O (0.5 mL) foi incubada a 37°C num tubo de RMN com agitação, adquirindo-se um espectro de próton (¹H RMN) após os tempos de incubação referidos.

Tabela VIII – Resultados da hidrólise, catalisada por esterase de fígado de porco, de **68**.^a

Tempo (horas)	Tempo (dias)	% Ester
0	0	100
0.5	0.02	99.65
7.2	0.30	99.49
22.2	0.93	98.44
43.2	1.8	98.25
51.2	2.1	98.25
114.2	4.8	97.84
121.8	5.1	97.75
168.8	7.0	97.61

^a Uma solução de **68** (0.020 g) com esterase de fígado de porco (0.020 g) em D₂O (0.5 mL) foi incubada a 37°C num tubo de RMN com agitação, adquirindo-se um espectro de próton (¹H RMN) após os tempos de incubação referidos.

Tabela IX – Resultados da hidrólise, catalisada por papaína, de **68**.^a

Tempo (horas)	Tempo (dias)	% Ester
0	0	100
0.5	0.02	99.88
1.0	0.04	99.82
26.5	1.1	99.26
49.5	2.1	98.61
95.5	4.0	97.69
166.5	6.9	97.12

^a Uma solução de **68** (0.020 g) com papaína (0.020 g) em D₂O (0.5 mL) foi incubada a 37°C num tubo de RMN com agitação, adquirindo-se um espectro de próton (¹H RMN) após os tempos de incubação referidos.

Tabela X – Resultados da hidrólise, catalisada por Newlase F, de **68**.^a

Tempo (horas)	Tempo (dias)	% Ester
0	0	100
0.5	0.02	99.59
2.0	0.08	99.21
23.5	1.0	97.85
43.5	1.8	96.35
116.5	4.9	94.95
158	6.6	93.66

^a Uma solução de **68** (0.020 g) com Newlase F (0.020 g) em D₂O (0.5 mL) foi incubada a 37°C num tubo de RMN com agitação, adquirindo-se um espectro de próton (¹H RMN) após os tempos de incubação referidos.

ESPECTROS DE RMN

Hidrogenossuccinato de etilo (29)	84
Hidrogenoglutarato de etilo (30)	86
Succinato de etilo e colina (33)	88
Glutarato de etilo e colina (34)	90
Adipato de metilo e colina (35)	92
Hidrogenododecanodioato de etilo (39)	94
Dodecanodioato dietílico (40)	96
Dodecanodioato de etilo de colina (41)	98
Hidrogenoglutarato de (\pm)-1-feniletilo (42)	101
Glutarato de (\pm)-1-feniletilo e colina (43)	103
Hidrogenomaleato de (\pm)-1-feniletilo (45)	106
Maleato de (\pm)-1-feniletilo e colina (46)	108
Cis-Rh ₂ (OAc) ₂ (OCOCF ₃) ₂ (54)	111
3-Bromopropanoato de etilo (60)	113
5-Bromopentanoato de etilo (61)	115
11-Bromoundecanoato de etilo (63)	117
Cloreto de [2-(carboxi)etil]trimetilamónio (64)	119
Cloreto de [4-(carboxi)butil]trimetilamónio (65)	122
Cloreto de [6-(carboxi)hexil]trimetilamónio (66)	125
Cloreto de [10-(carboxi)decil]trimetilamónio (67)	128
Cloreto de hidrogenoglutarilcolina (68)	131

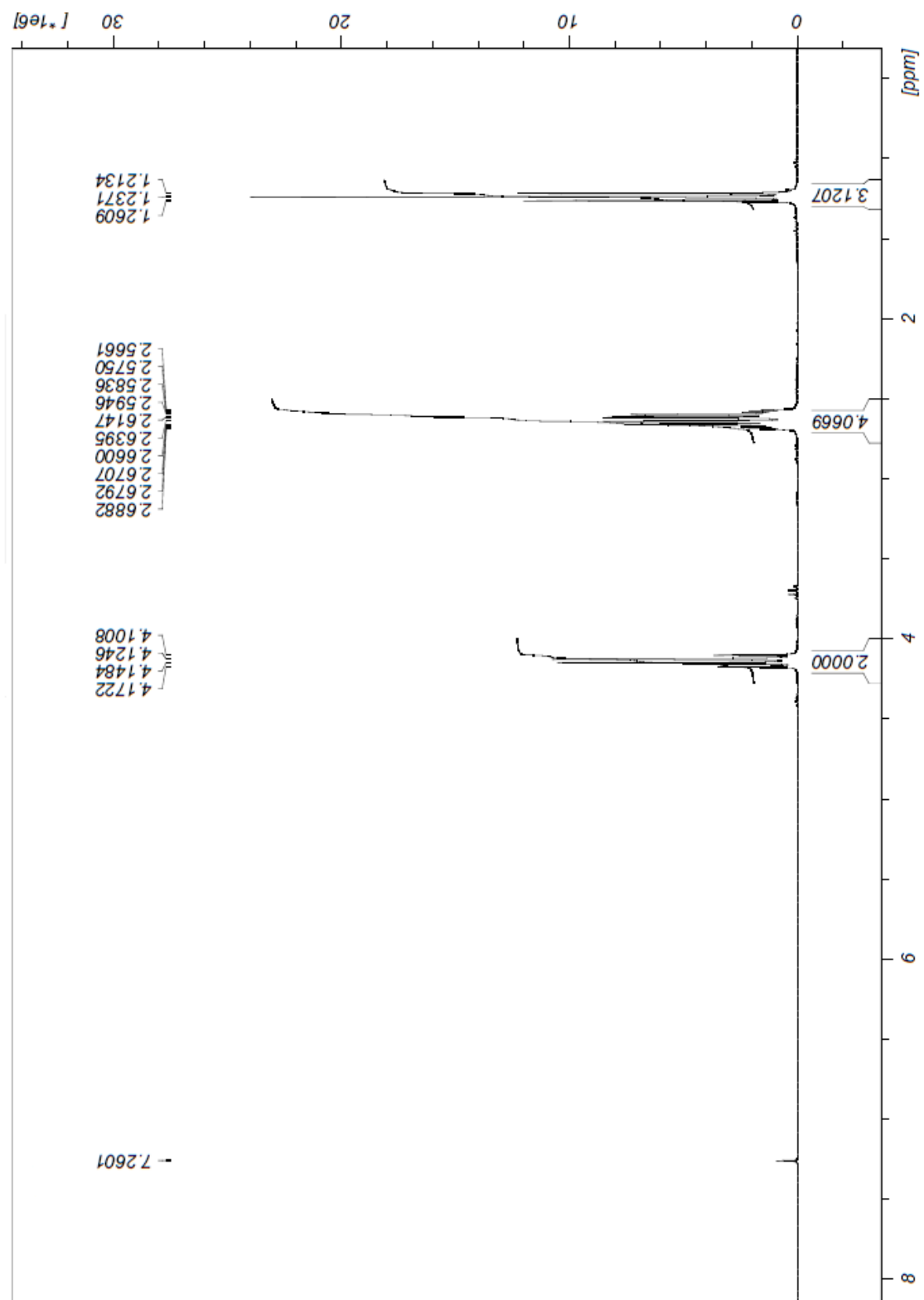


Figura III – Espectro de ^1H RMN (300 MHz) de hidrogenosuccinato de etilo (**29**) em CDCl_3 à temperatura ambiente.

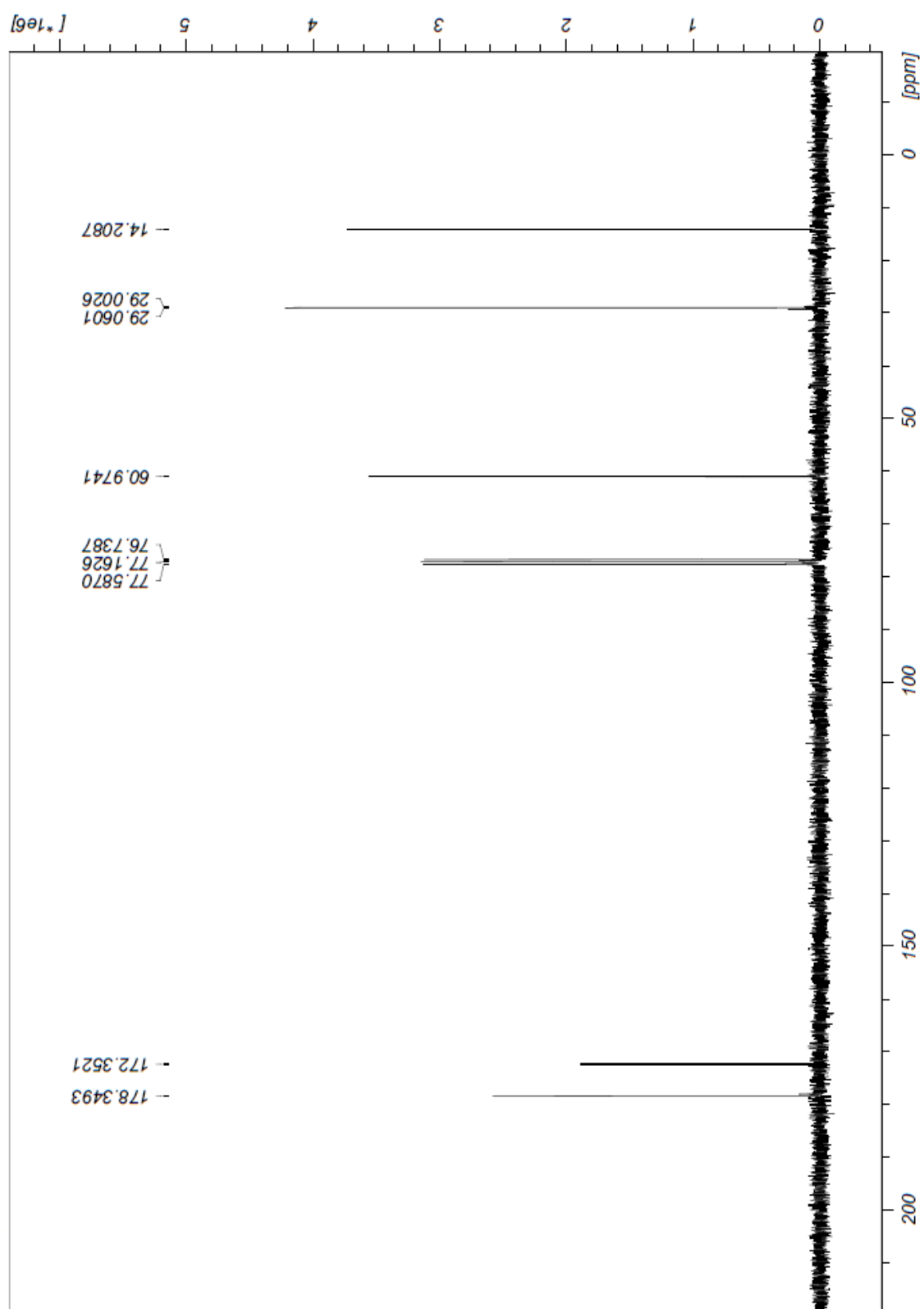


Figura IV – Espectro de ^{13}C RMN (75 MHz) de hidrogenosuccinato de etilo (**29**) em CDCl_3 à temperatura ambiente.

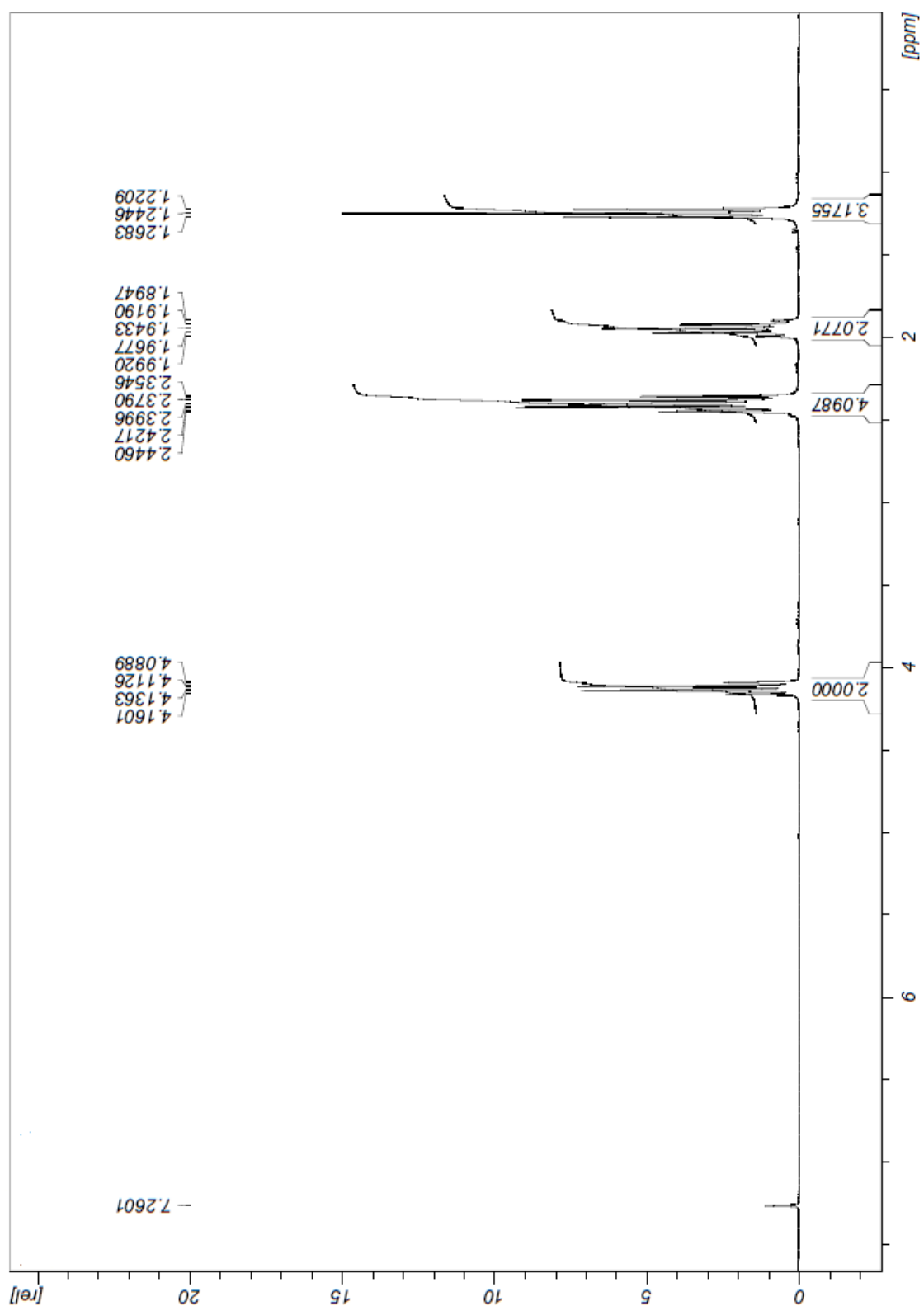


Figura V – Espectro de ^1H RMN (300 MHz) de hidrogenoglutarato de etilo (**30**) em CDCl_3 à temperatura ambiente.

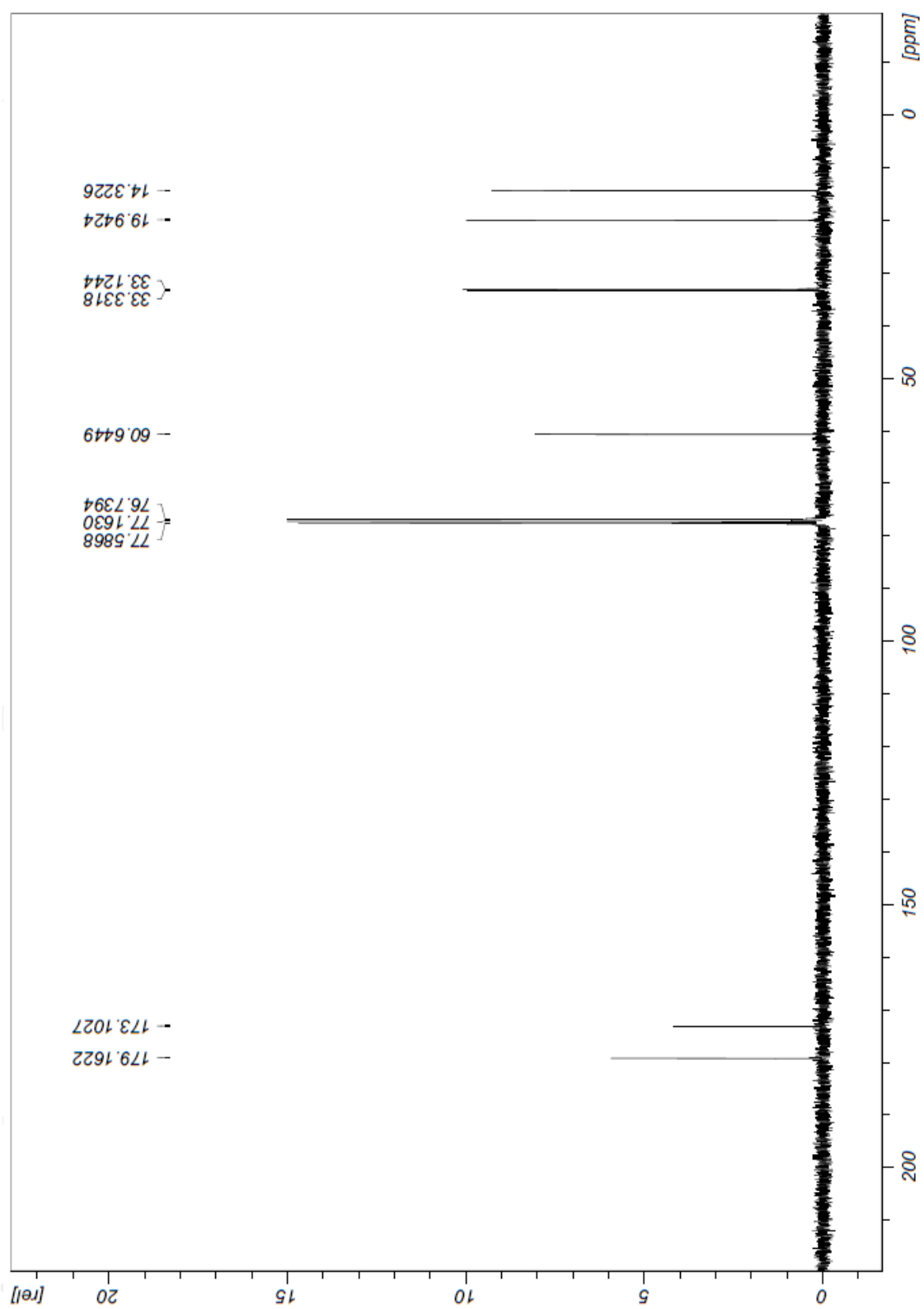


Figura VI – Espectro de ^{13}C RMN (75 MHz) de hidrogenoglutarato de etilo (**30**) em CDCl_3 à temperatura ambiente.

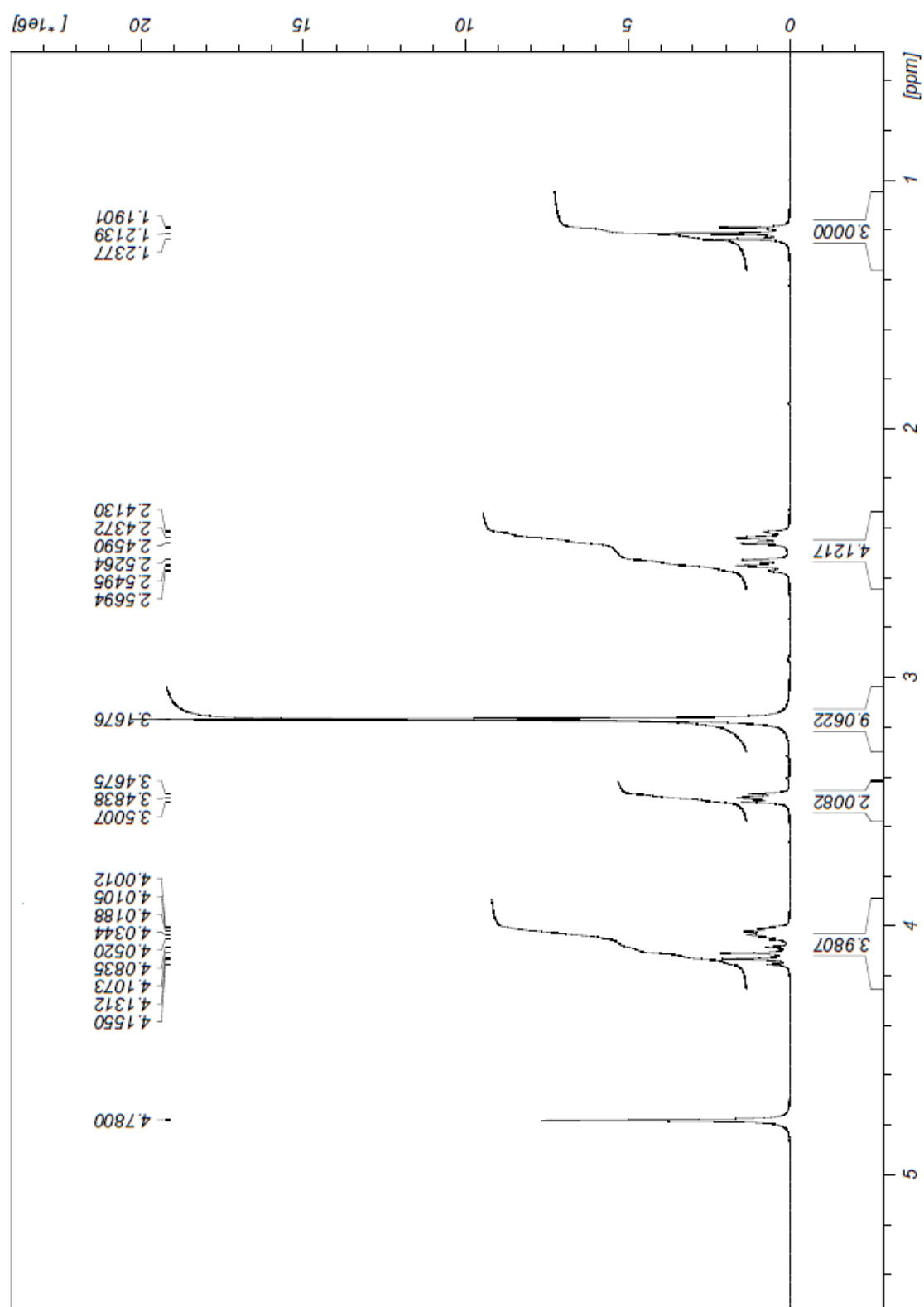


Figura VII – Espectro de ^1H RMN (300 MHz) de succinato de etilo e colina (**33**) em D_2O à temperatura ambiente.

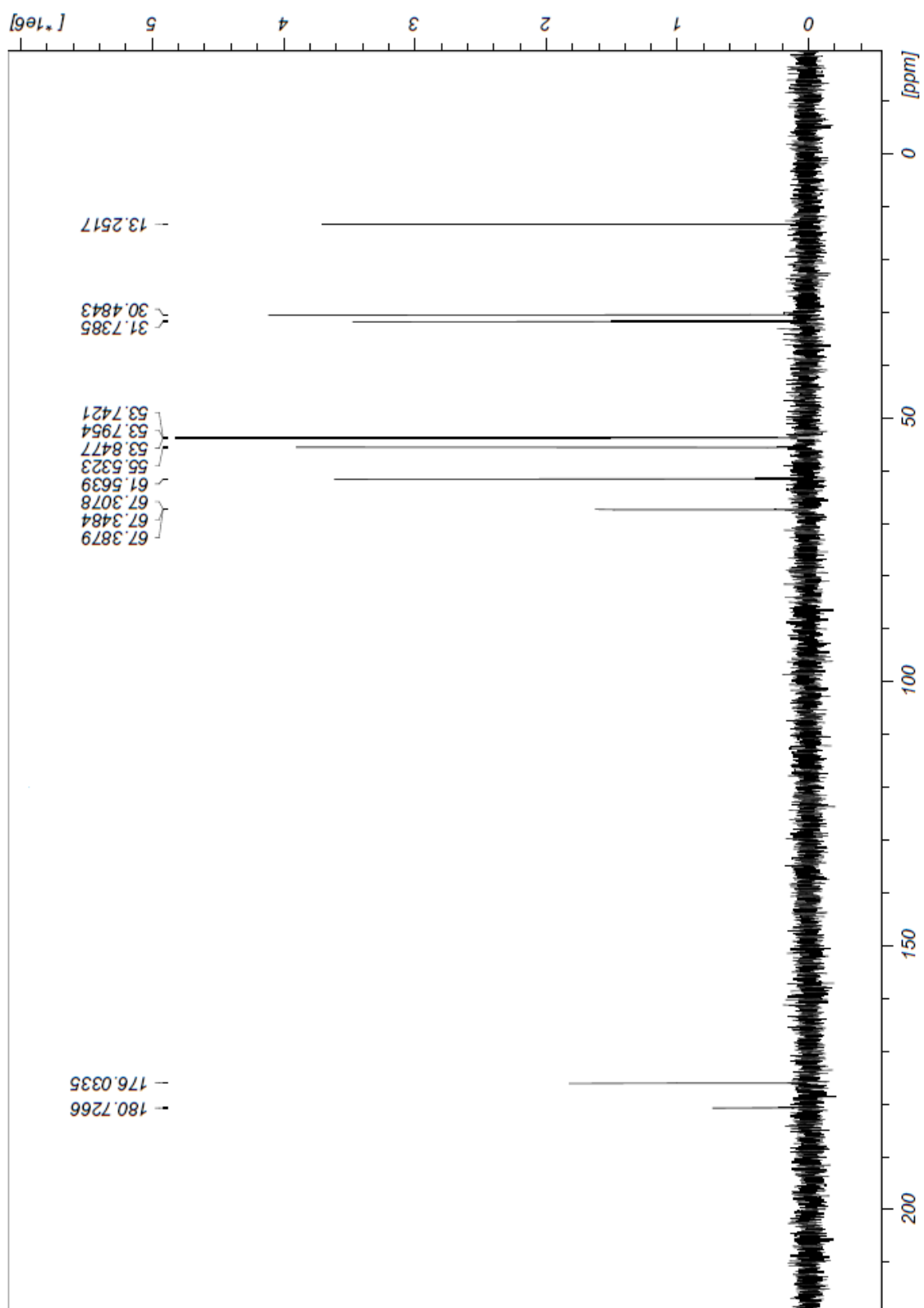


Figura VIII – Espectro de ^{13}C RMN (75 MHz) de succinato de etilo e colina (**33**) em D_2O à temperatura ambiente.

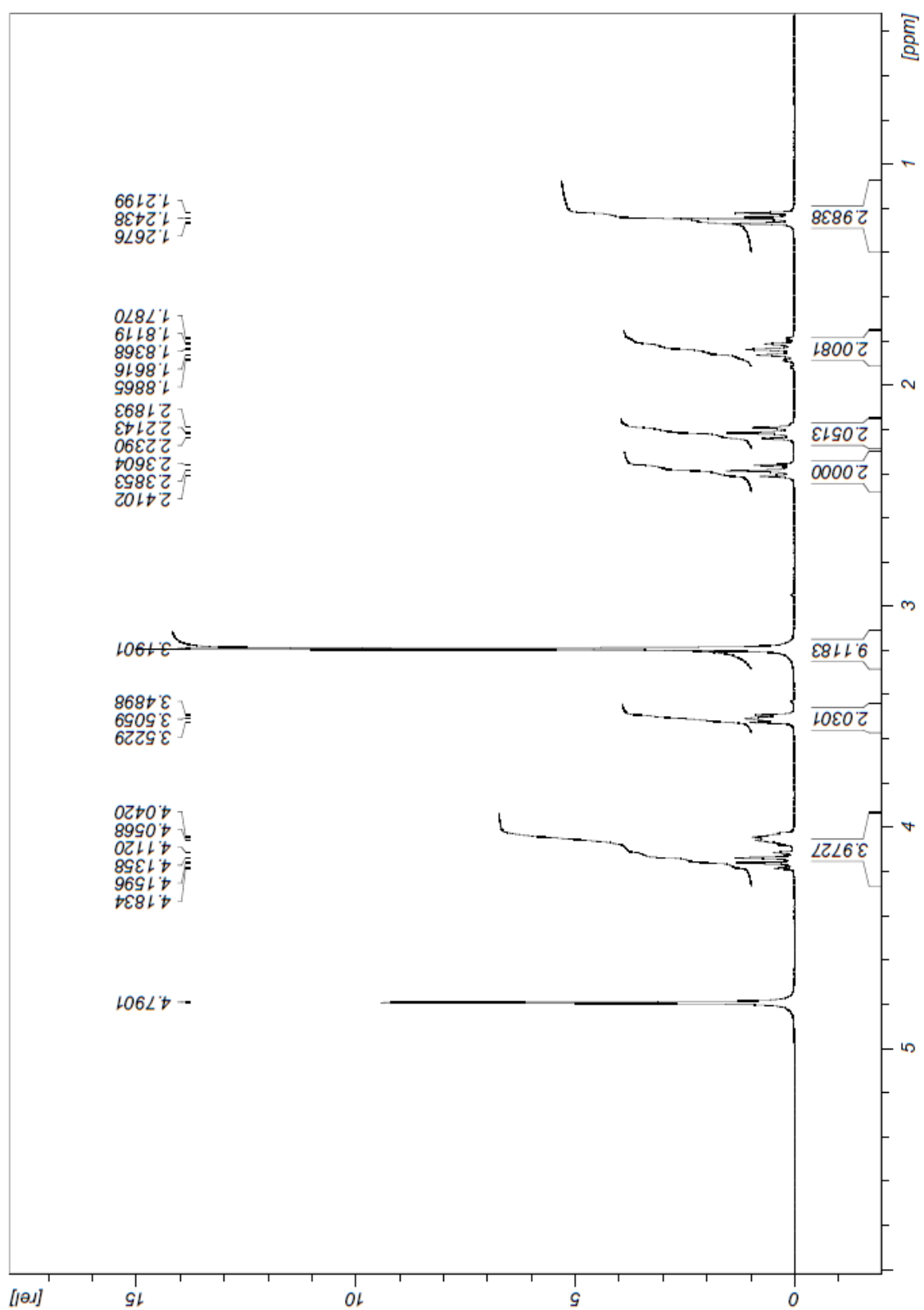


Figura IX – Espectro de ^1H RMN (300 MHz) de glutarato de etilo e colina (**34**) em D_2O à temperatura ambiente.

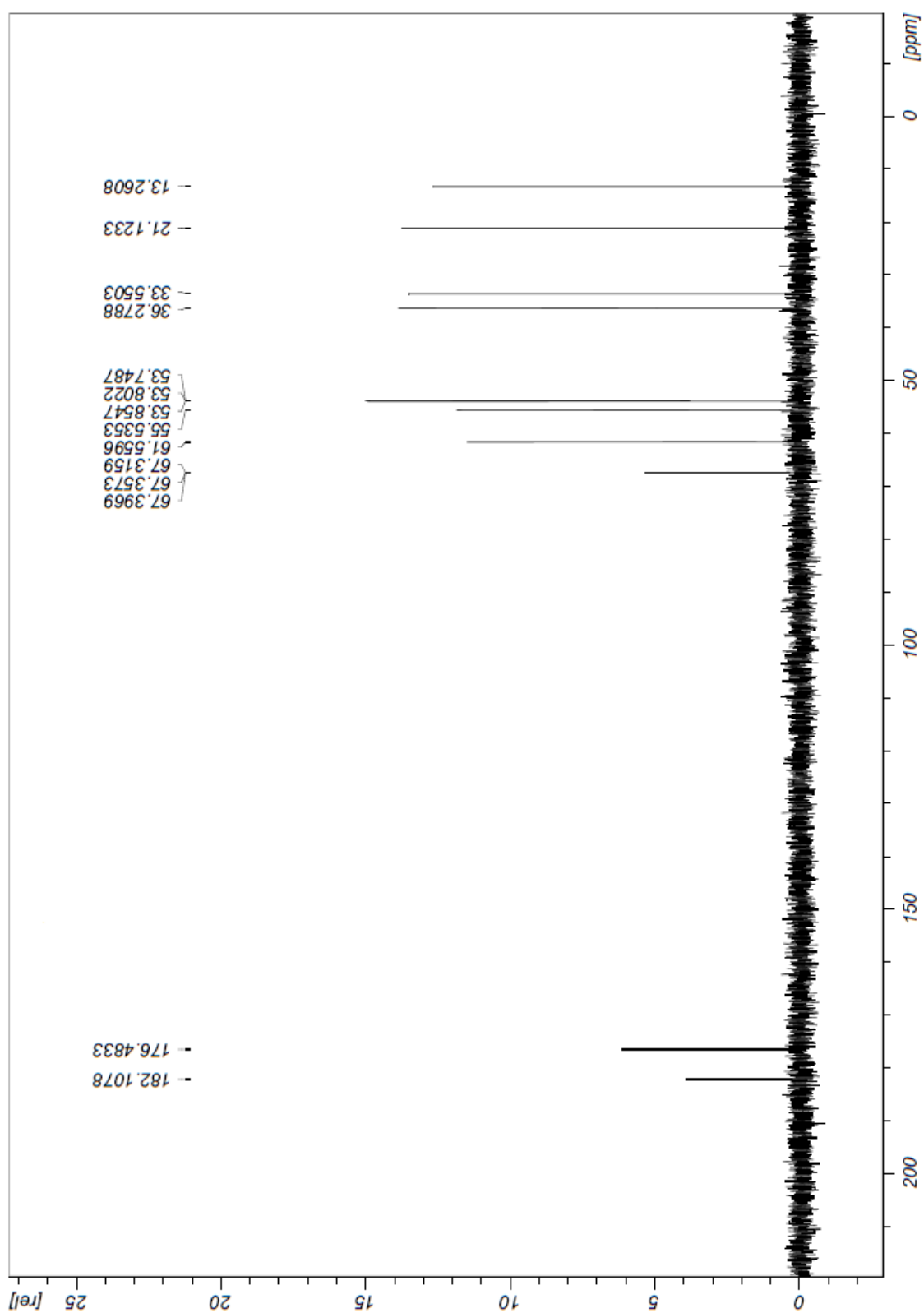


Figura X – Espectro de ^{13}C RMN (75 MHz) de glutarato de etilo e colina (**34**) em D_2O à temperatura ambiente.

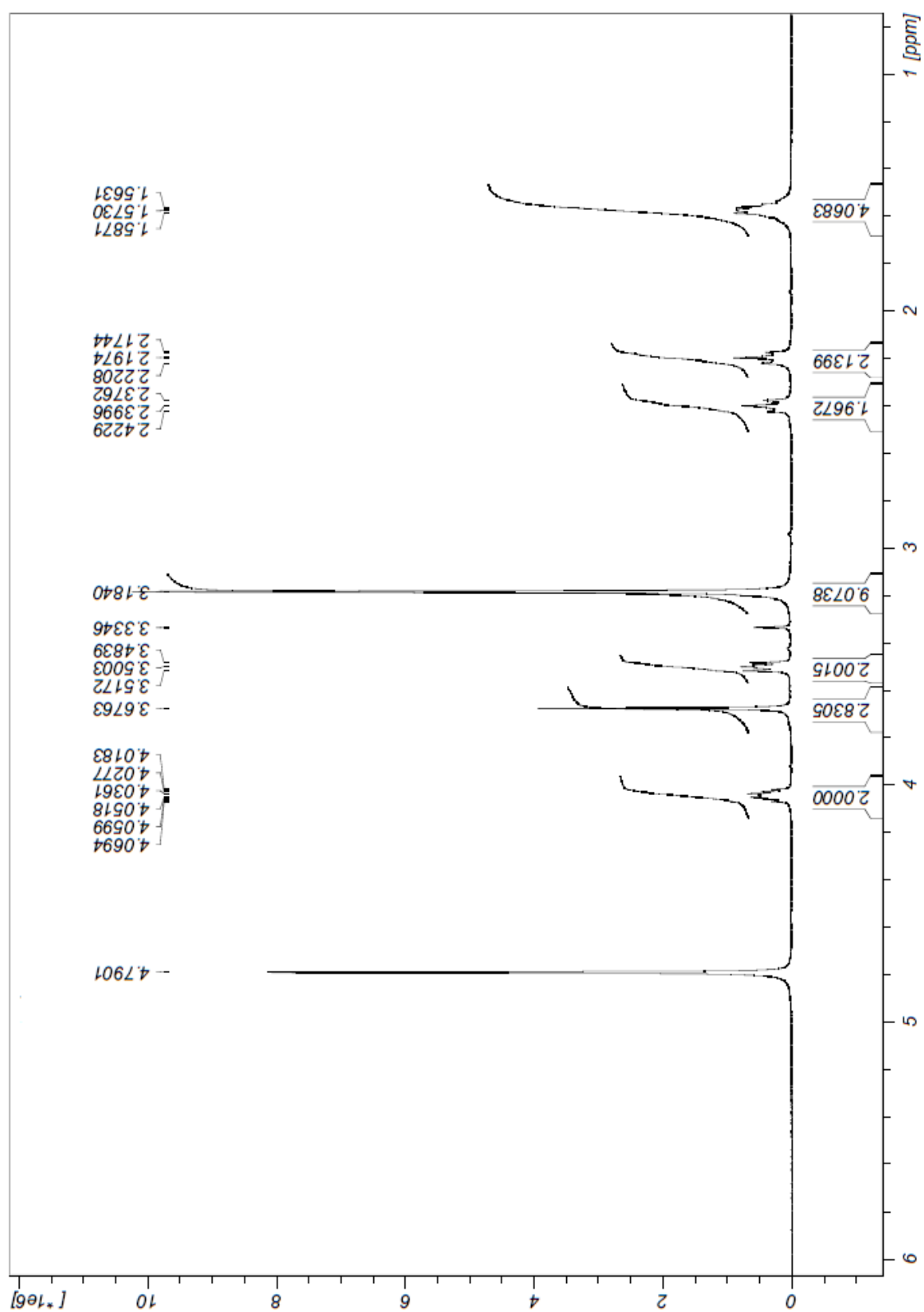


Figura XI – Espectro de ^1H RMN (300 MHz) de adipato de etilo e colina (**35**) em D_2O à temperatura ambiente.

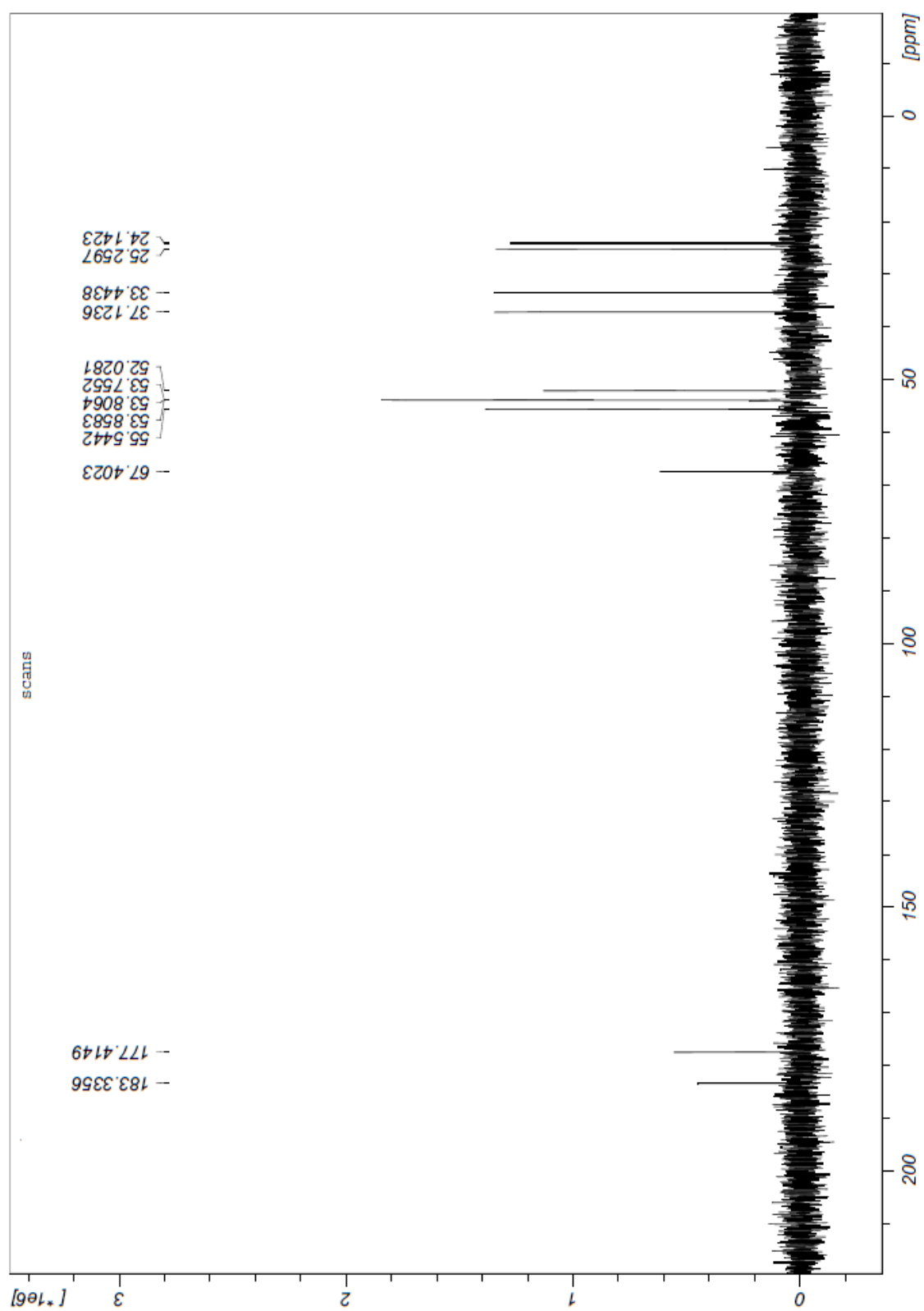


Figura XII – Espectro de ^{13}C RMN (75 MHz) de adipato de etilo e colina (**35**) em D_2O à temperatura ambiente.

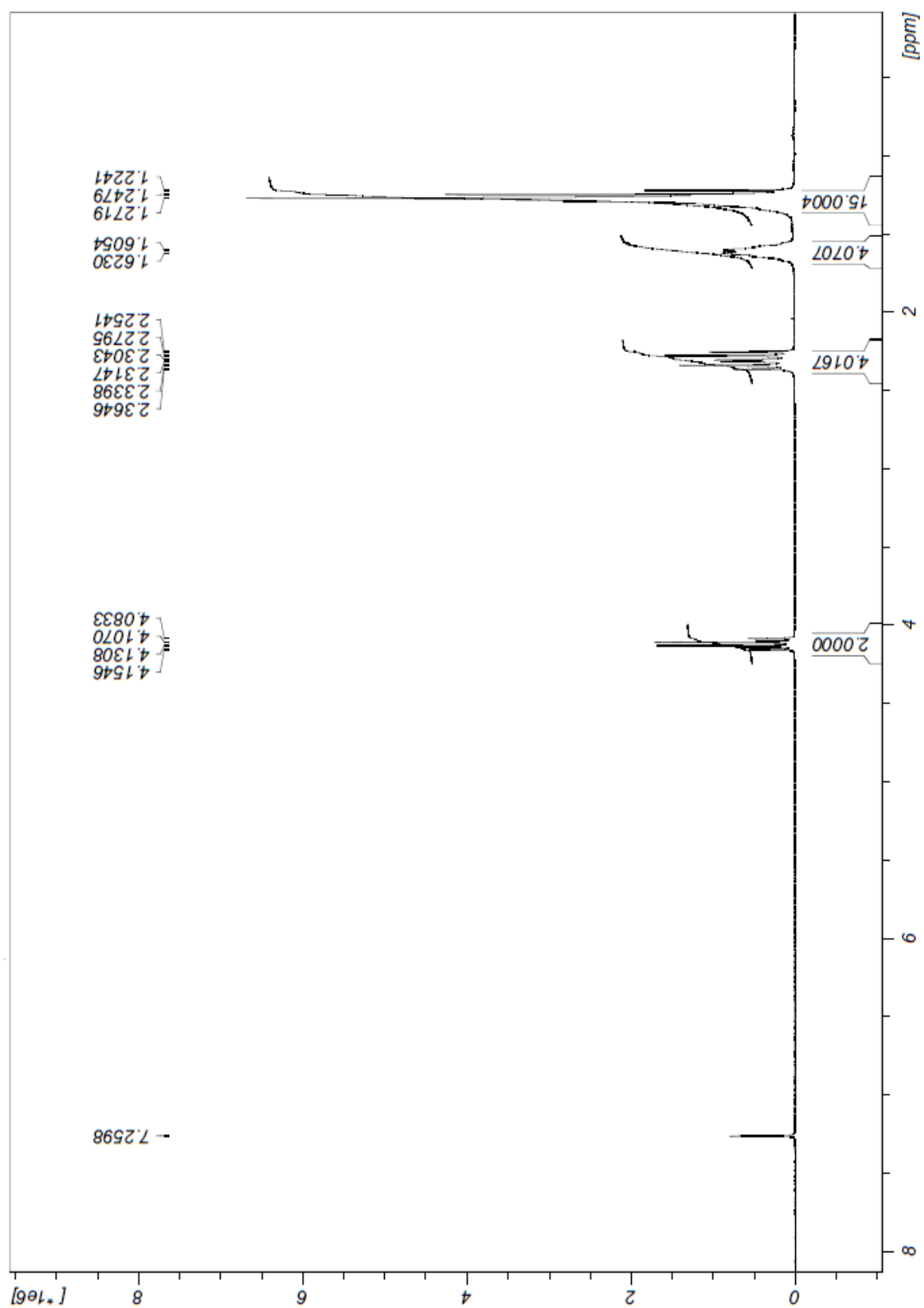


Figura XIII – Espectro de ^1H RMN (300 MHz) de hidrogenododecanodioato de etilo (**39**) em CDCl_3 à temperatura ambiente.

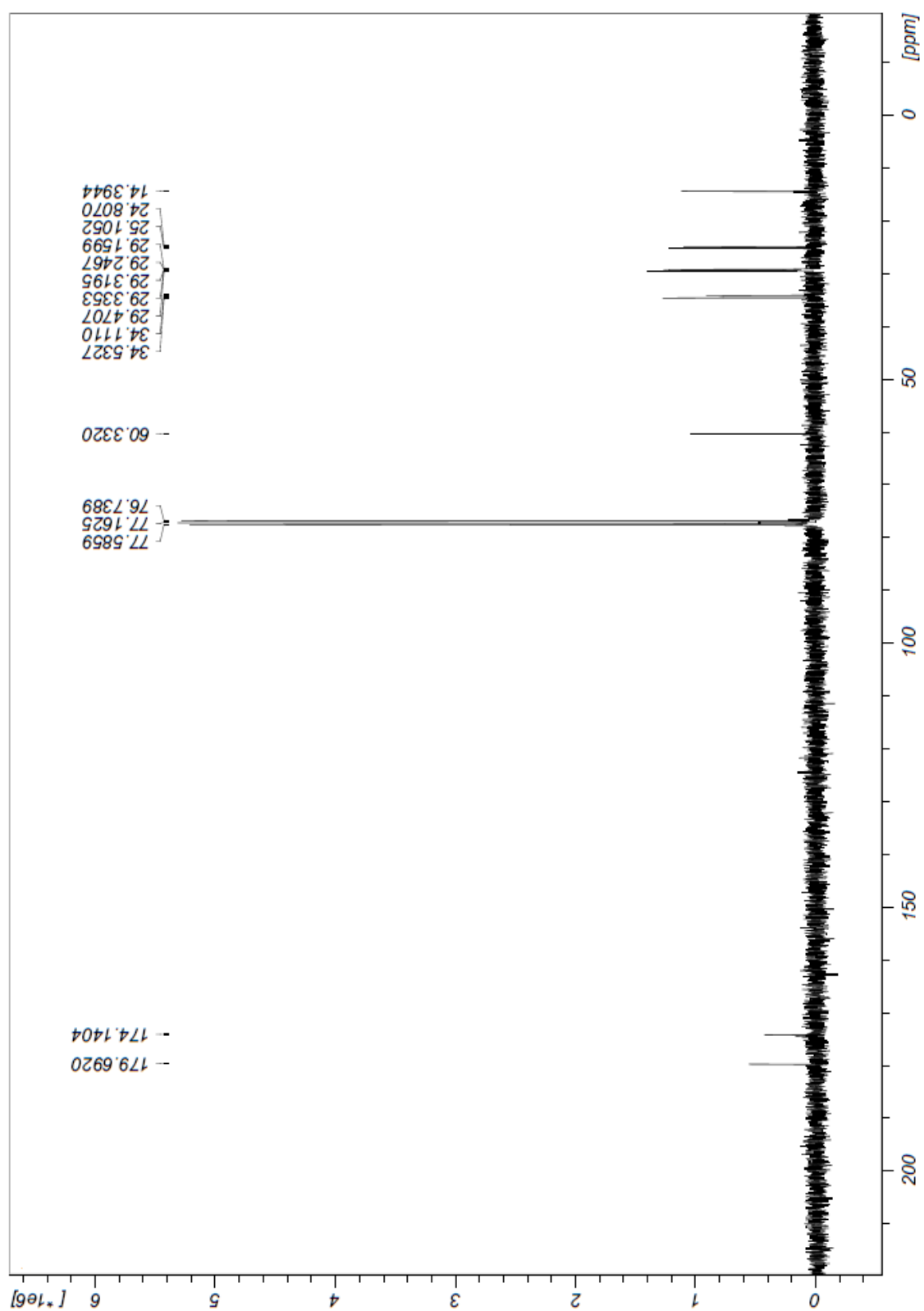


Figura XIV – Espectro de ^{13}C RMN (75 MHz) de hidrogenododecanodioato de etilo (**39**) em CDCl_3 à temperatura ambiente.

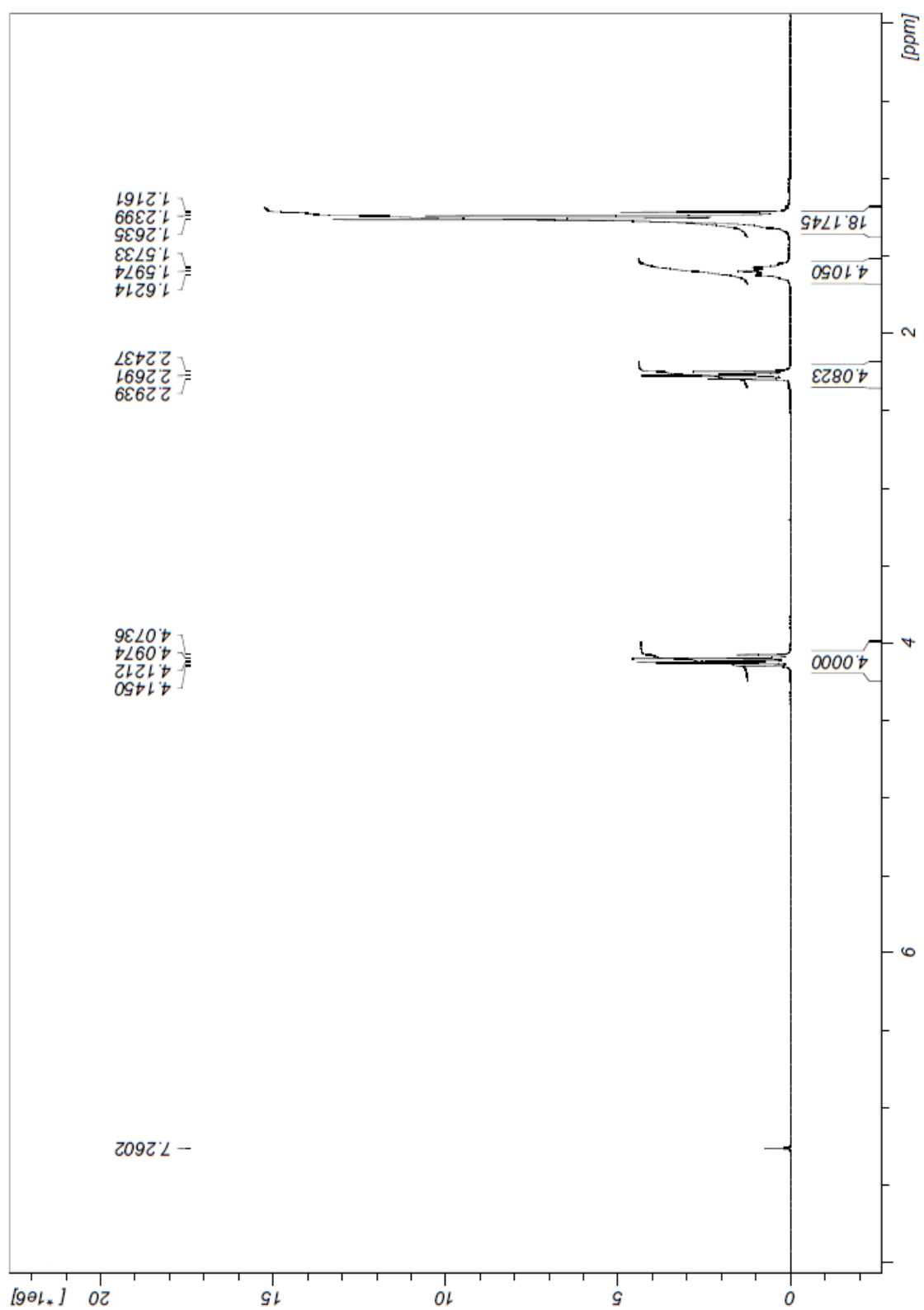


Figura XV – Espectro de ^1H RMN (300 MHz) de dodecanodioato dietílico (**40**) em CDCl_3 à temperatura ambiente.

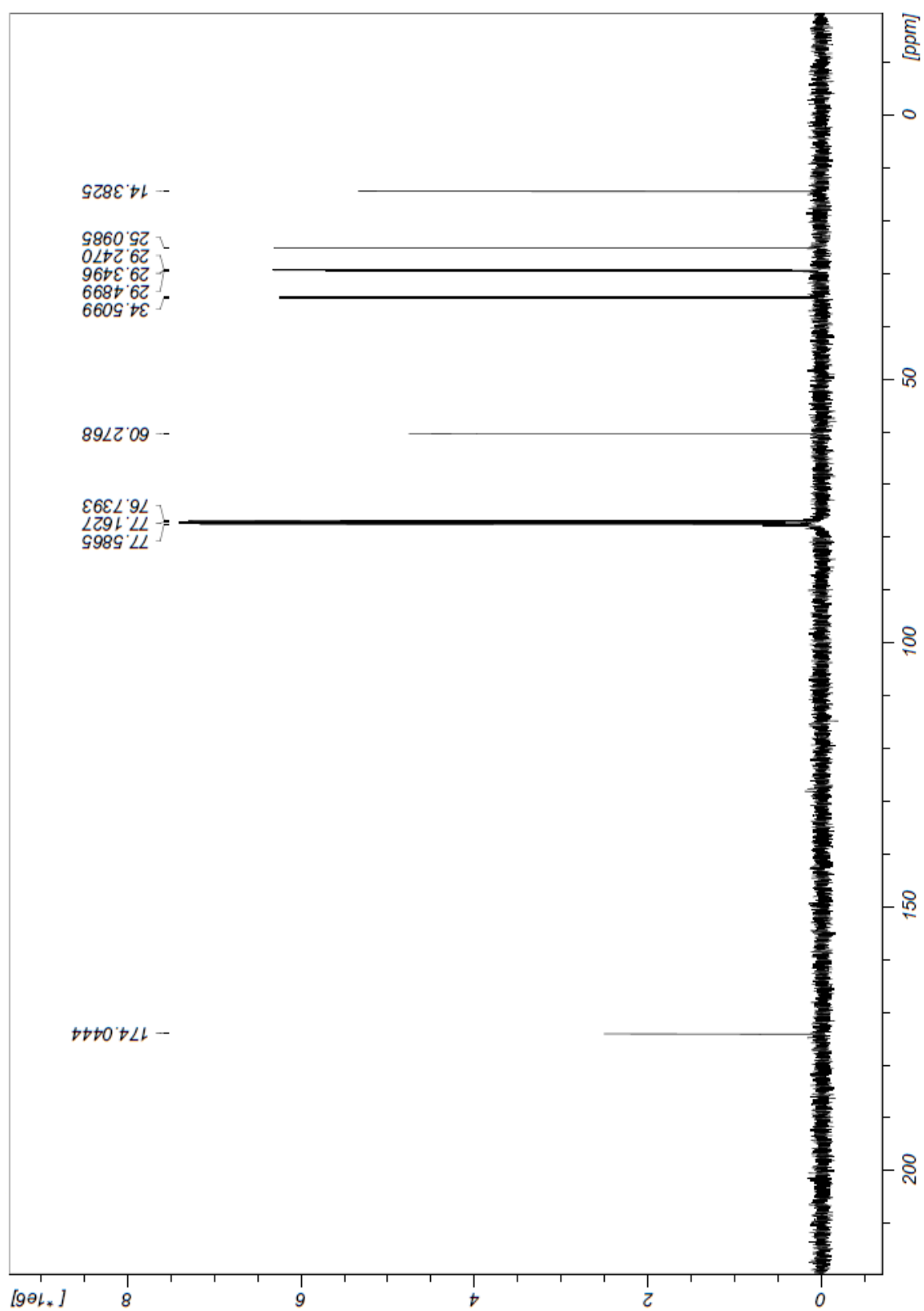


Figura XVI – Espectro de ^{13}C RMN (75 MHz) de dodecanodioato dietílico (**40**) em CDCl_3 à temperatura ambiente.

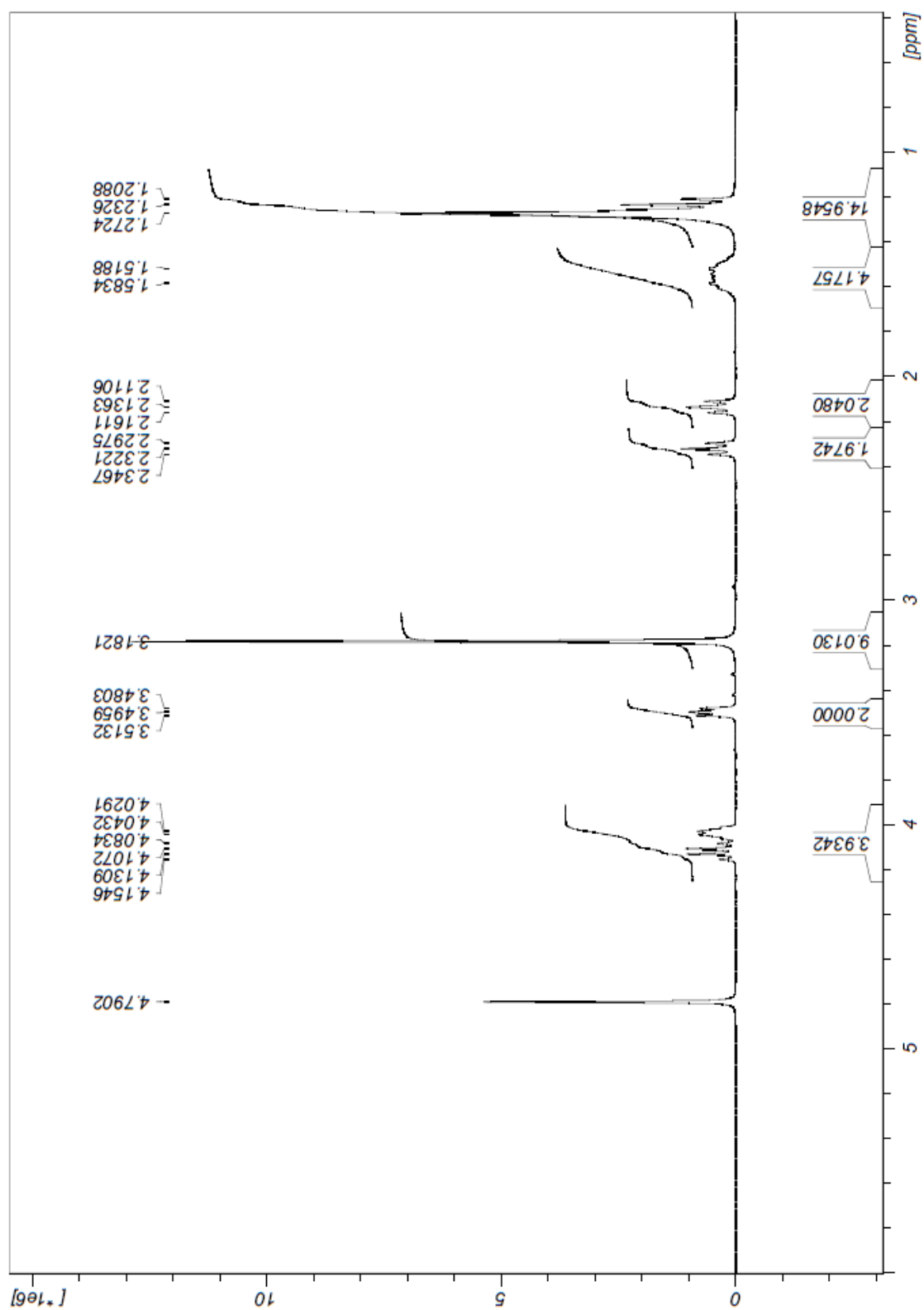


Figura XVII – Espectro de ^1H RMN (300 MHz) de dodecanodioato de etilo e colina (**41**) em D_2O à temperatura ambiente.

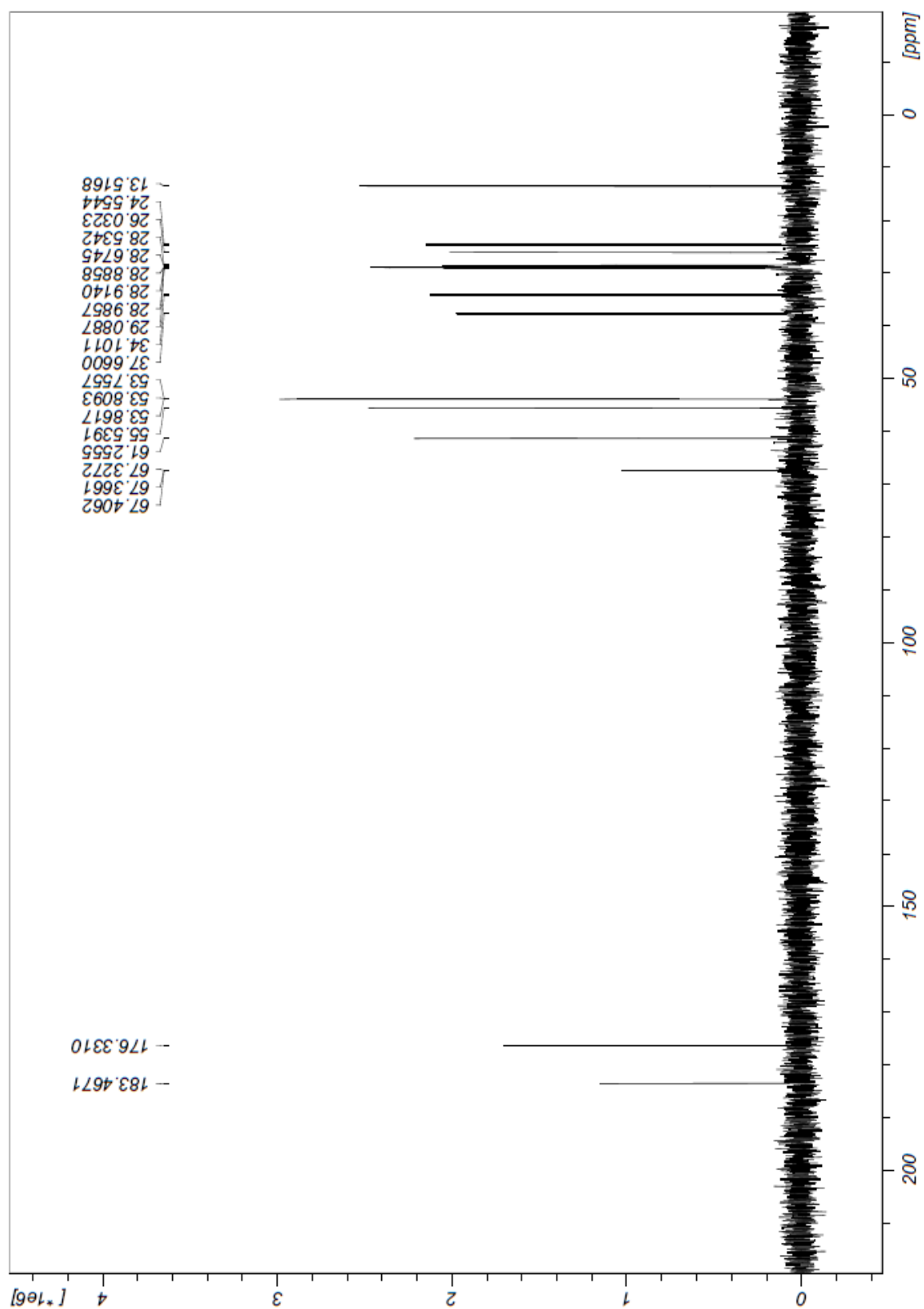


Figura XVIII – Espectro de ^{13}C RMN (75 MHz) de dodecanodioato de etilo e colina (**41**) em D_2O à temperatura ambiente.

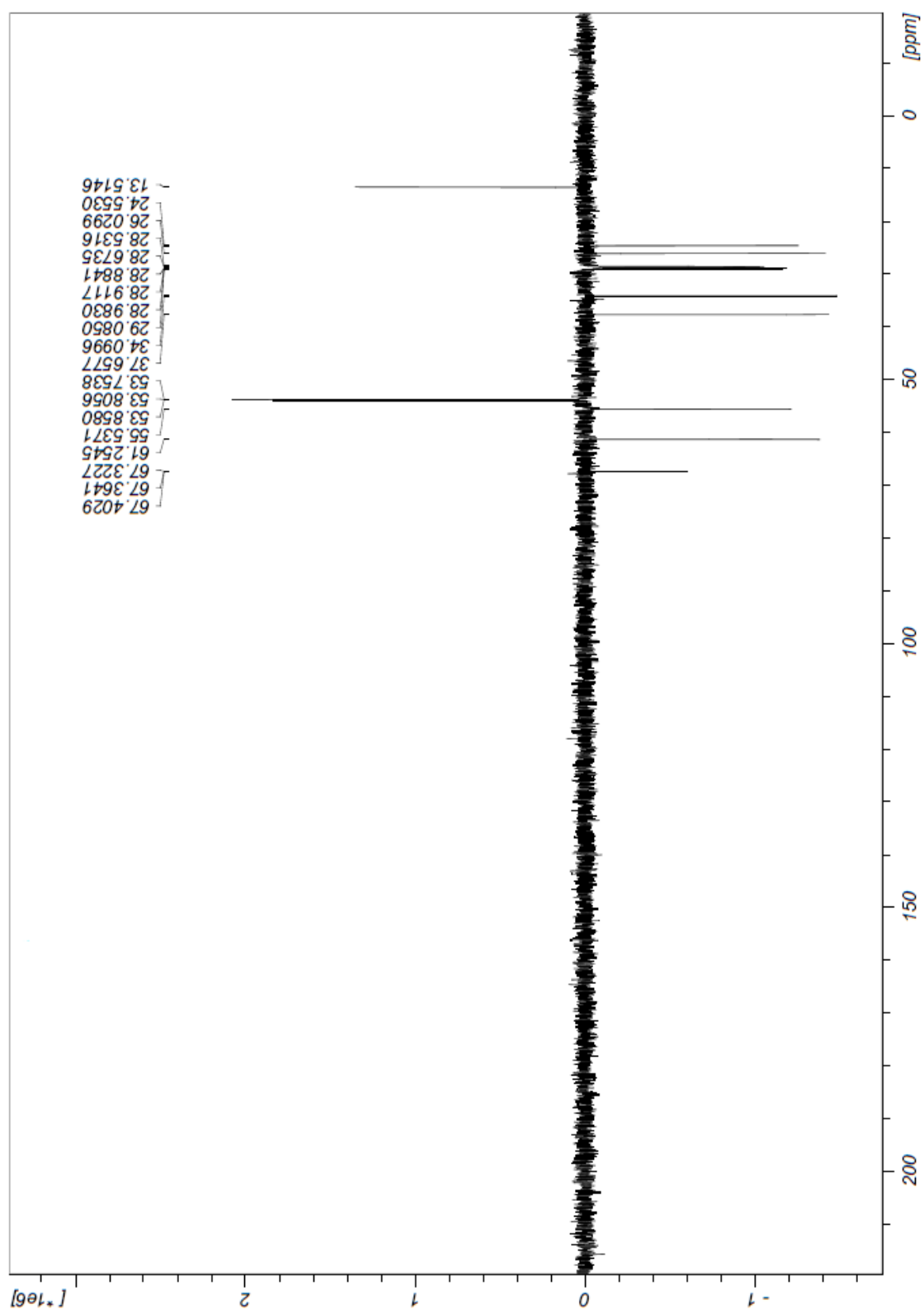


Figura XIX – Espectro de ^{13}C DEPT RMN (75 MHz) de dodecanodioato de etilo e colina (**41**) em D_2O à temperatura ambiente.

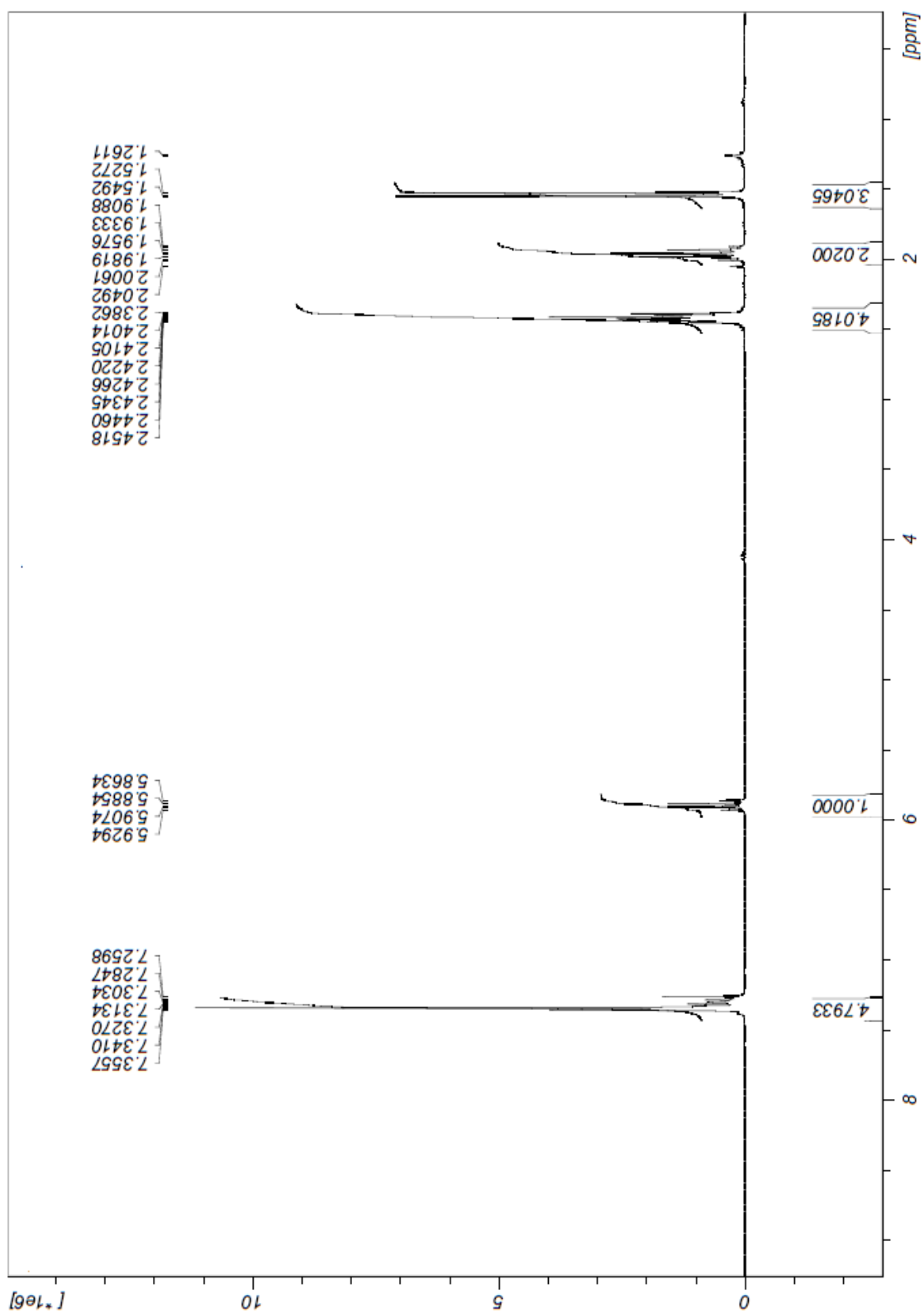


Figura XX – Espectro de ^1H RMN (300 MHz) de hidrogenoglutarato de (±)-1-feniletilo (**42**) em CDCl_3 à temperatura ambiente.

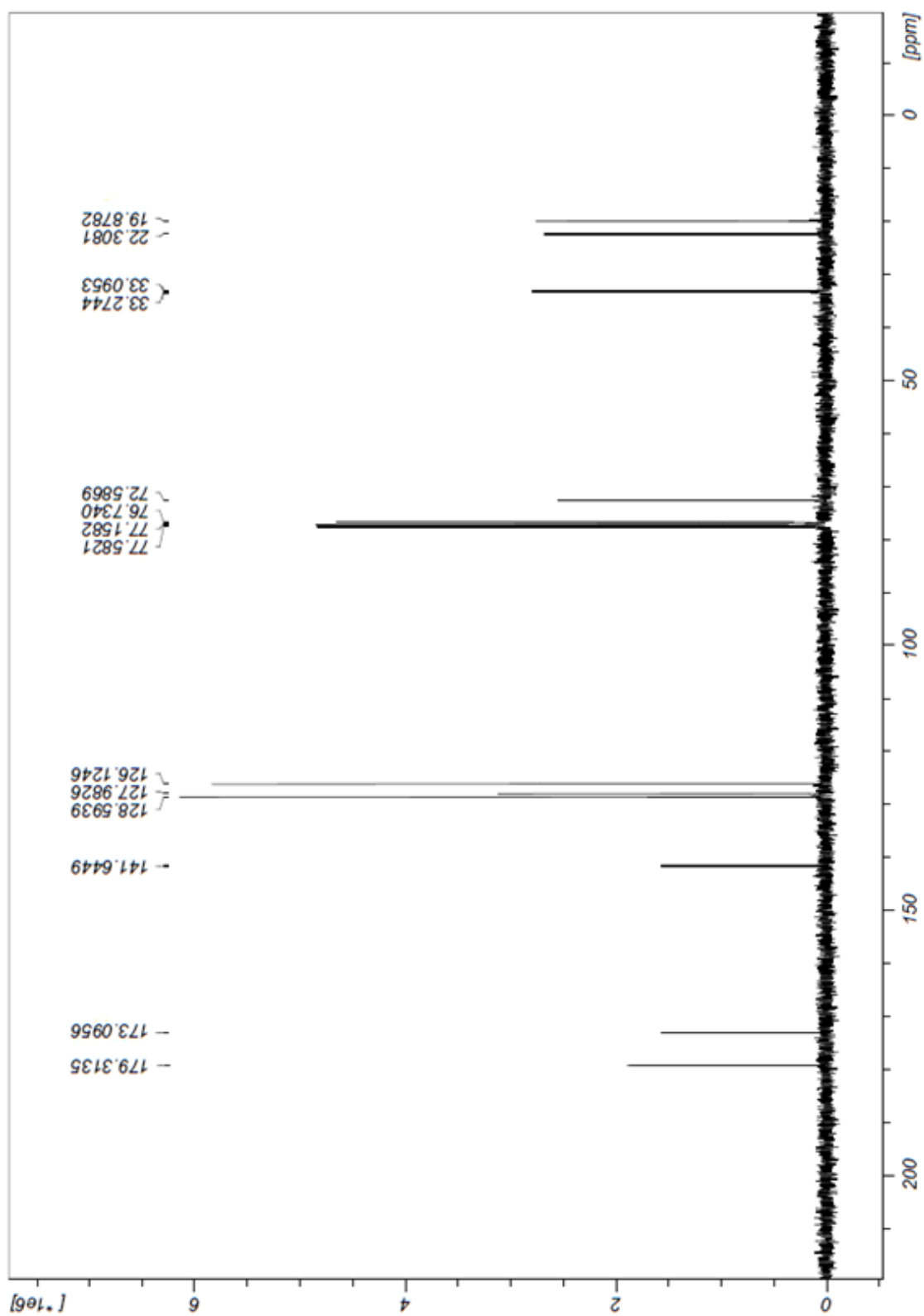


Figura XXI – Espectro de ^{13}C RMN (75 MHz) de hidrogenoglutarato de (\pm)-1-feniletilo (**42**) em CDCl_3 à temperatura ambiente.

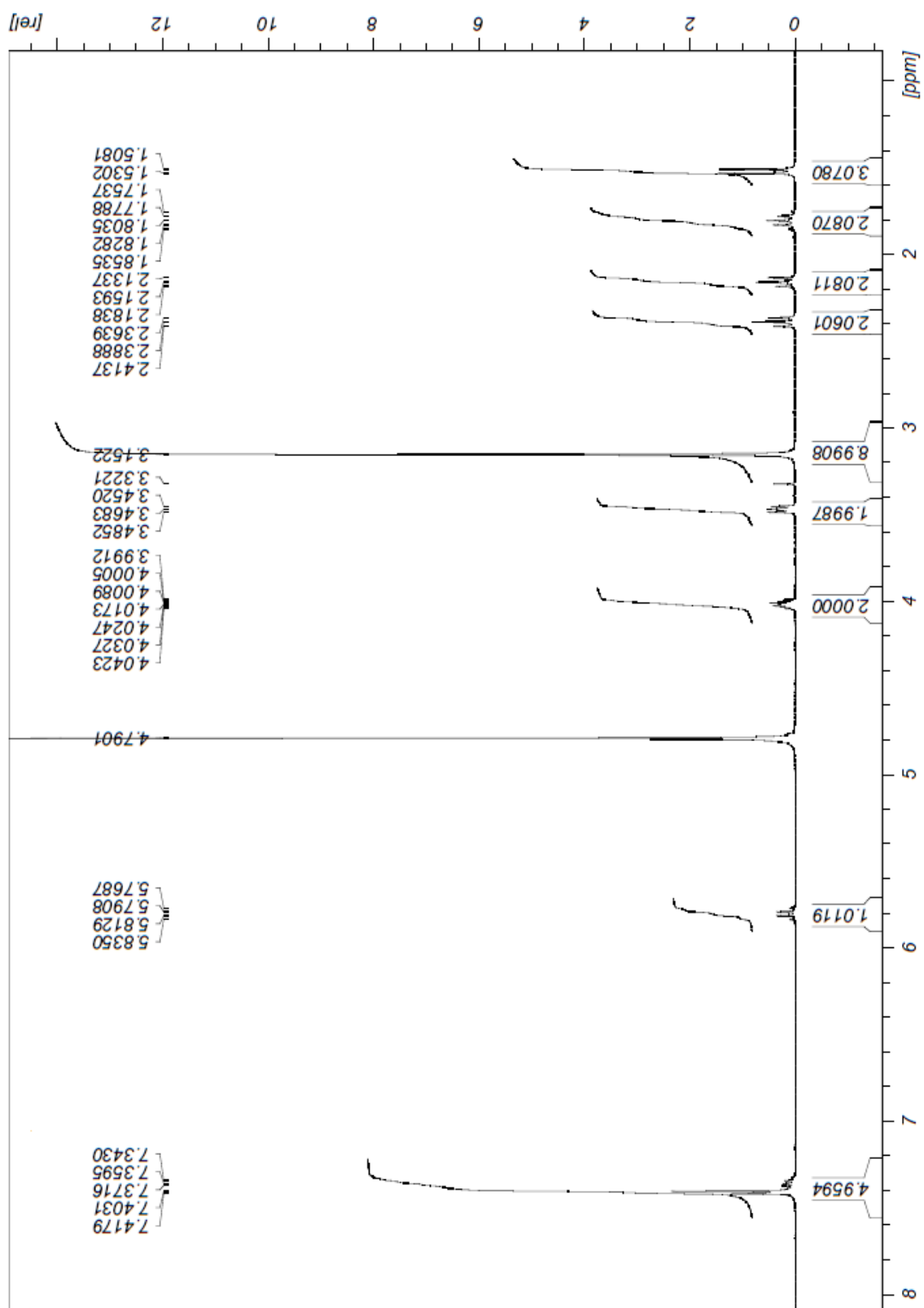


Figura XXII – Espectro de ^1H RMN (300 MHz) de glutarato de (\pm)-1-feniletilo e colina (**43**) em D_2O à temperatura ambiente.

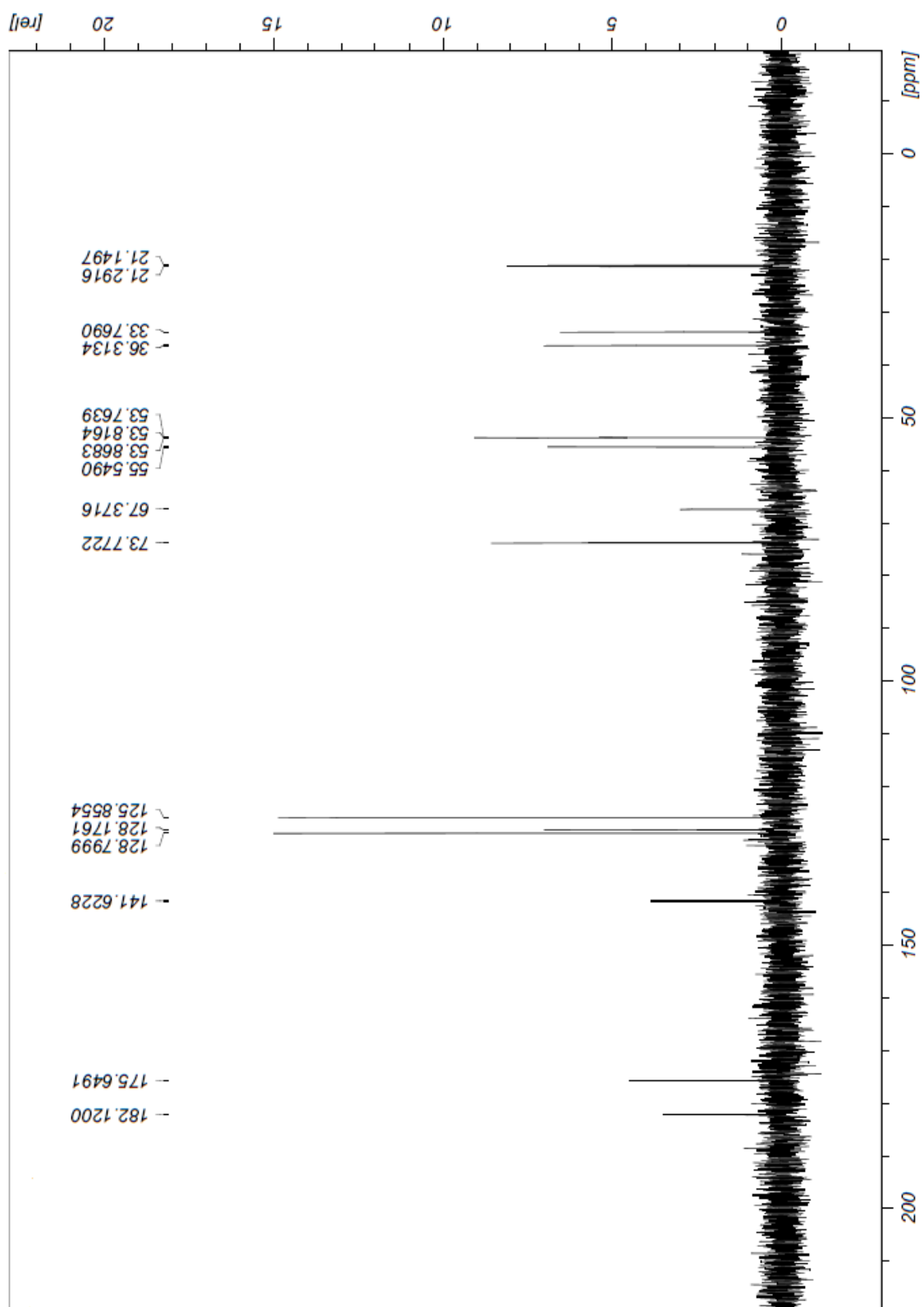


Figura XXIII – Espectro de ^{13}C RMN (75 MHz) de glutarato de (±)-1-feniletilo e colina (43) em D₂O à temperatura ambiente.

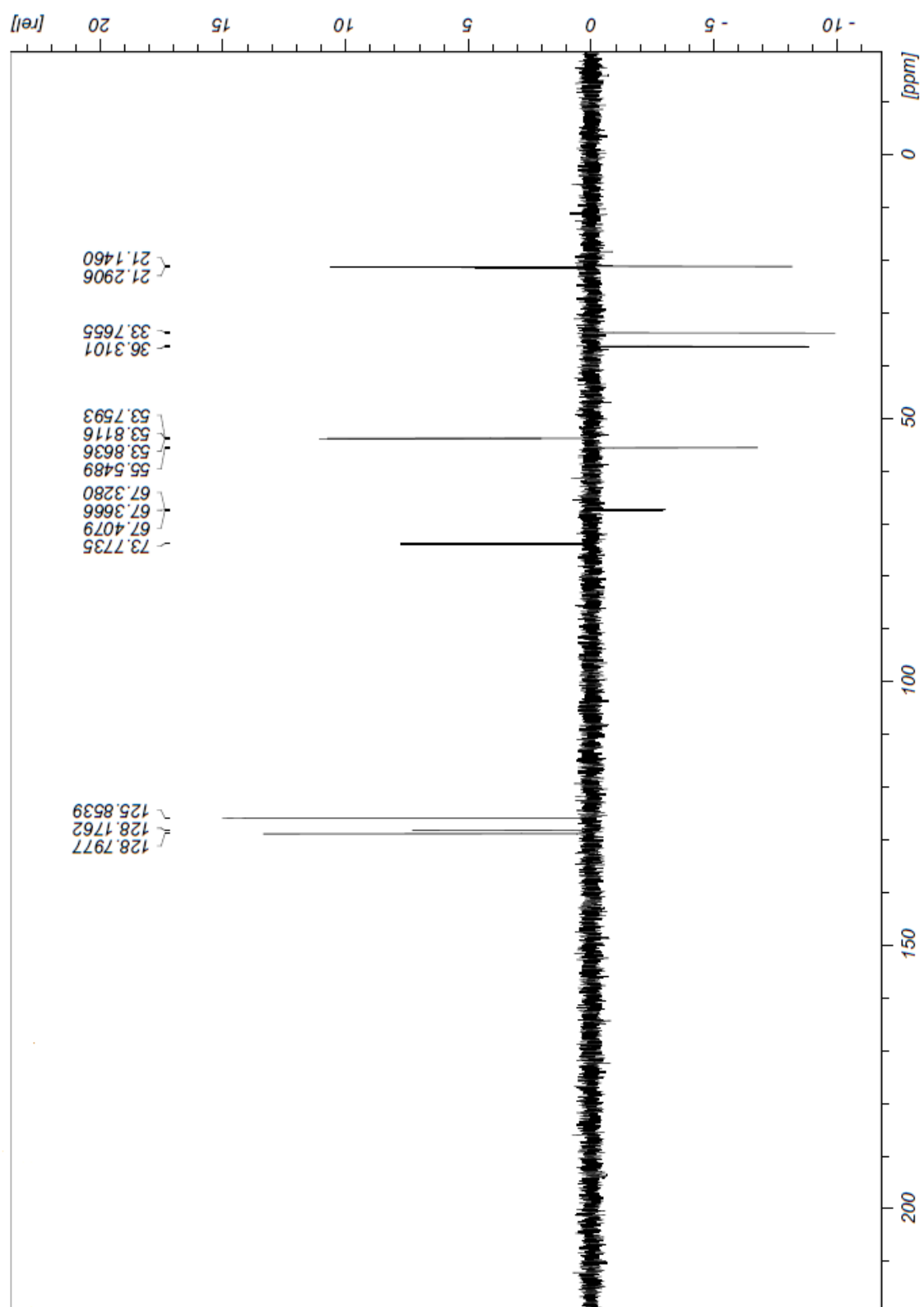


Figura XXIV – Espectro de ^{13}C DEPT RMN (75 MHz) de glutarato de (±)-1-feniletilo e colina (**43**) em D_2O à temperatura ambiente.

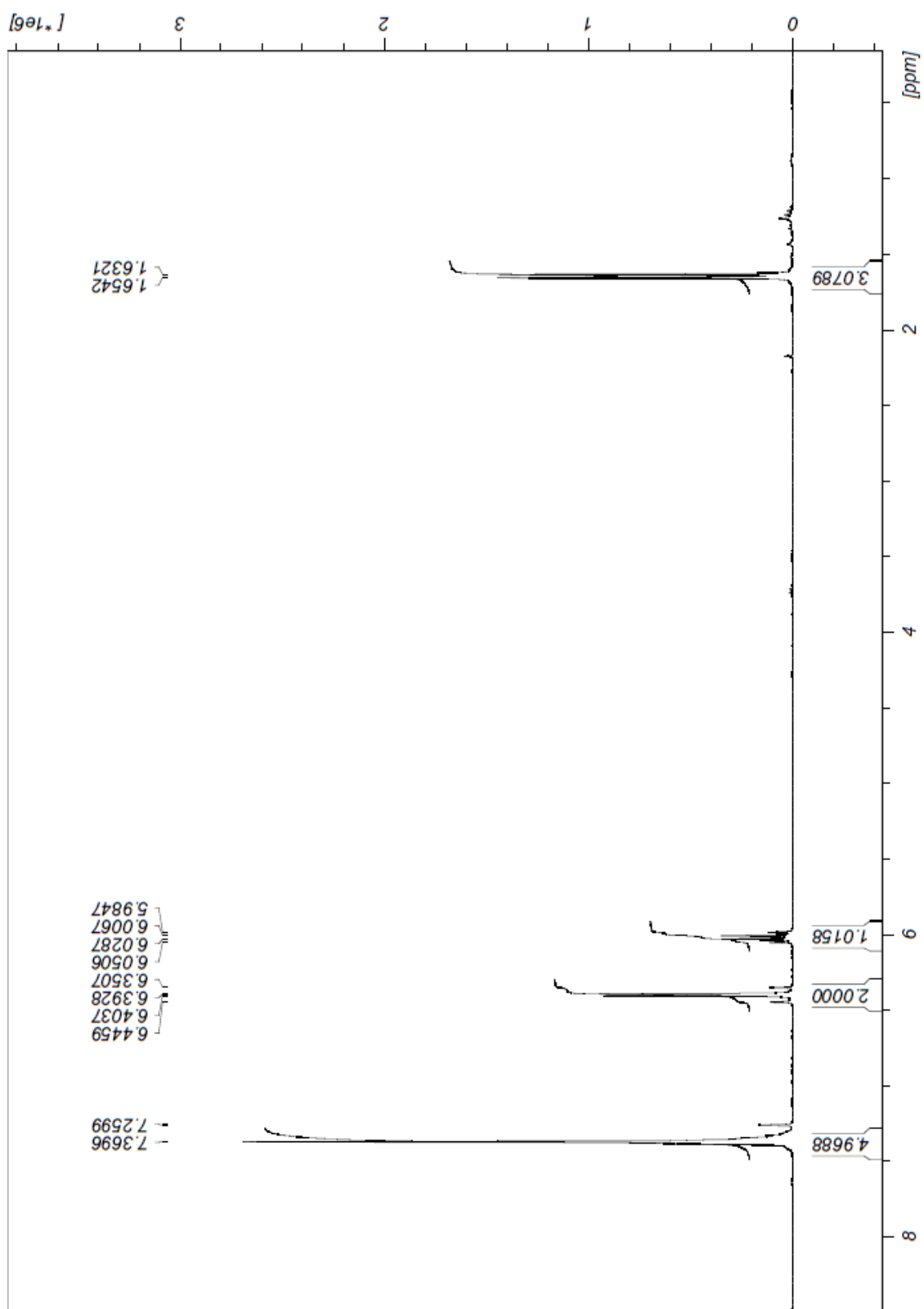


Figura XXV – Espectro de ^1H RMN (300 MHz) de hidrogenomaleato de (\pm)-1-feniletilo (**45**) em CDCl_3 à temperatura ambiente.

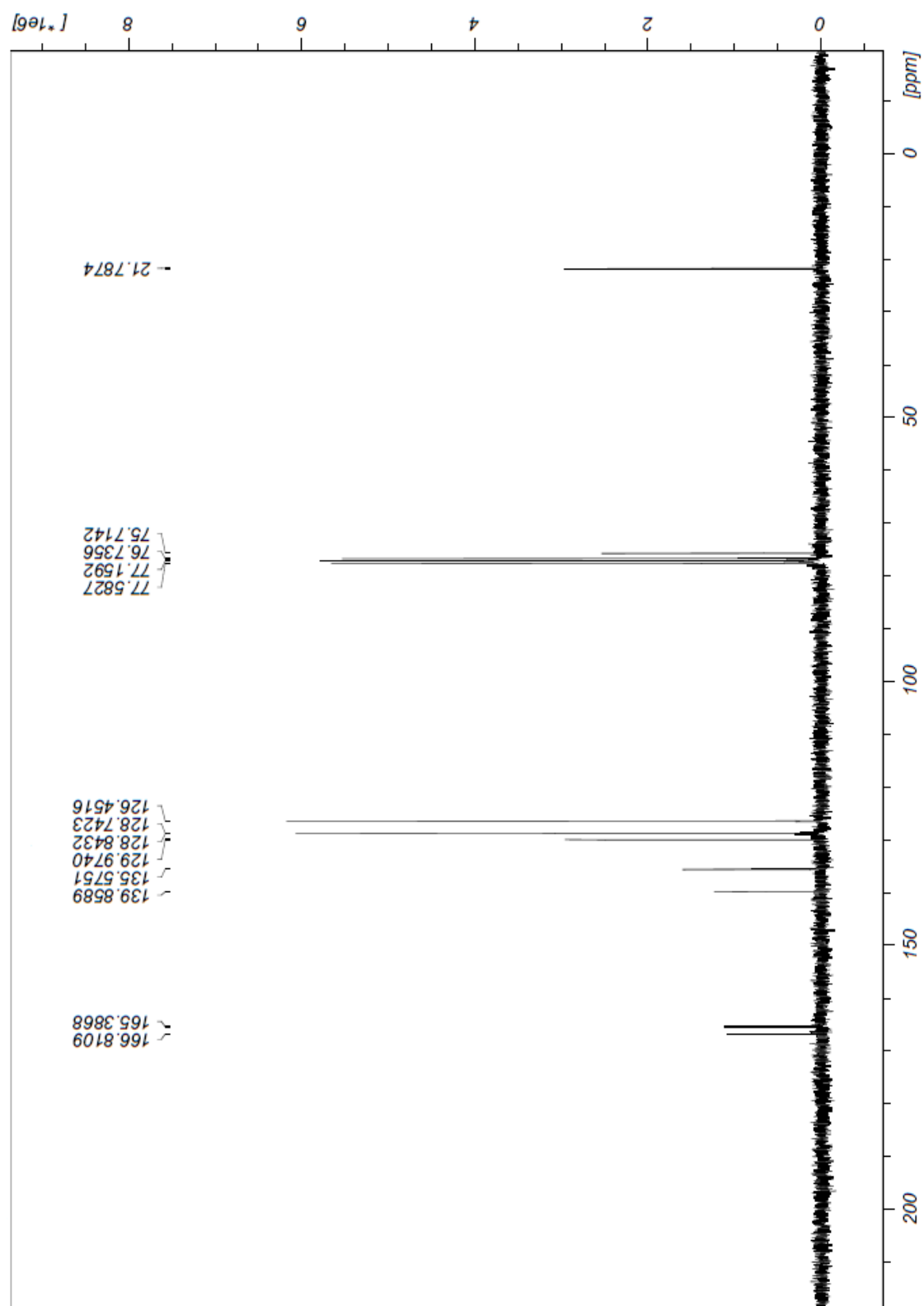


Figura XXVI – Espectro de ^{13}C RMN (75 MHz) de hidrogenomaleato de (±)-1-feniletilo (**45**) em CDCl_3 à temperatura ambiente.

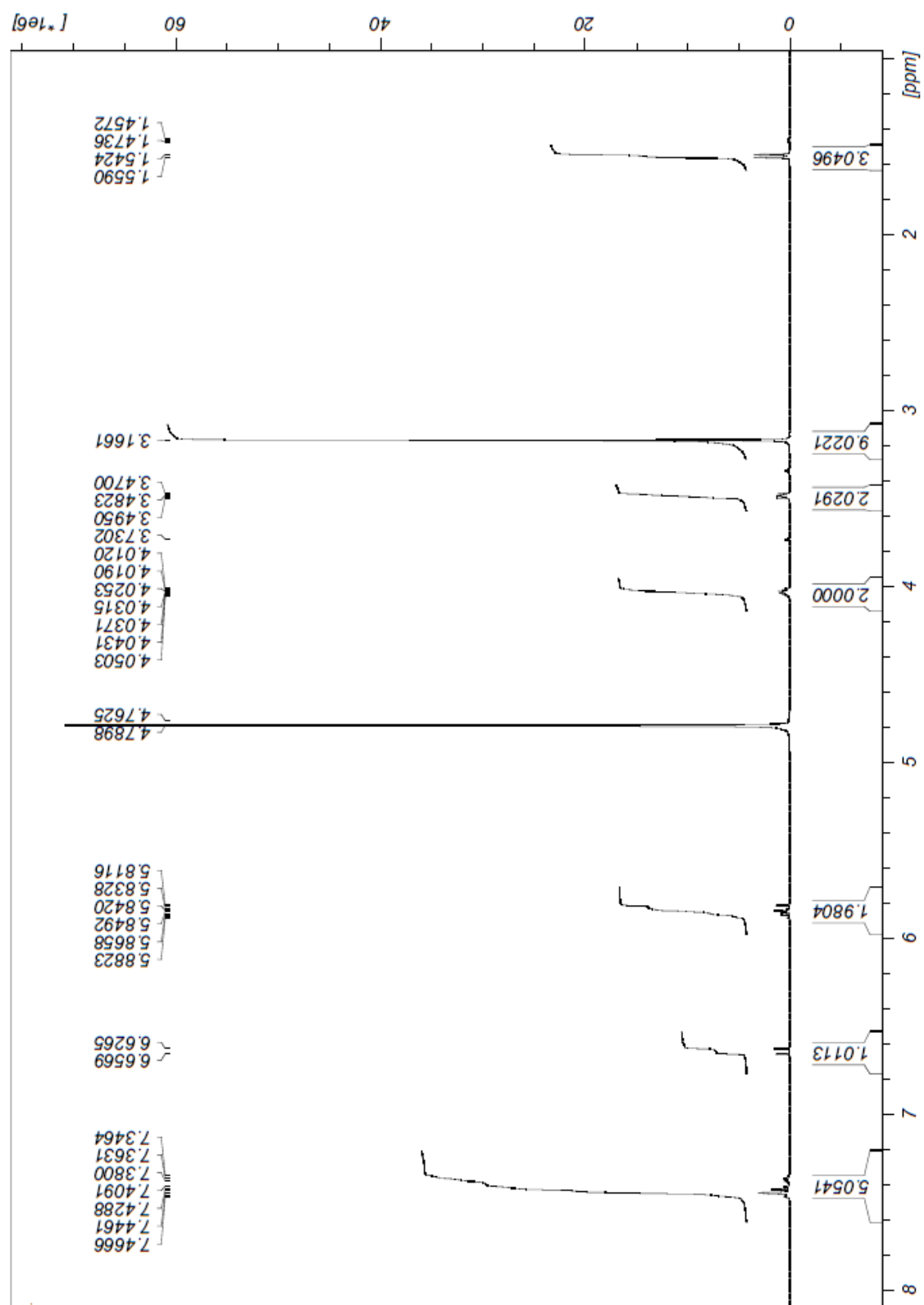


Figura XXVII – Espectro de ^1H RMN (300 MHz) de maleato de (\pm)-1-feniletilo e colina (**46**) em D_2O à temperatura ambiente.

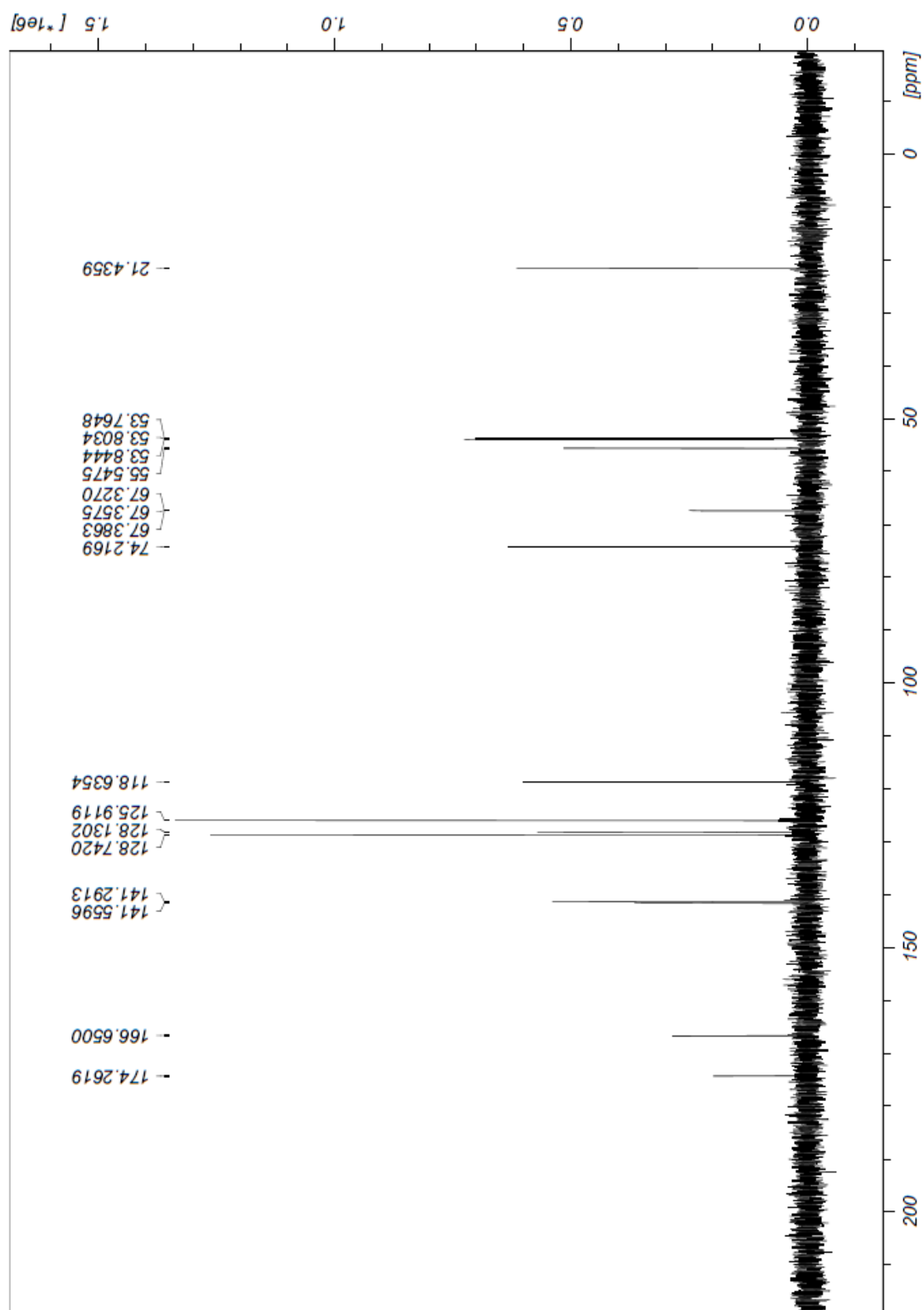


Figura XXVIII – Espectro de ^{13}C RMN (75 MHz) de maleato de (\pm)-1-feniletilo e colina (**46**) em D_2O à temperatura ambiente.

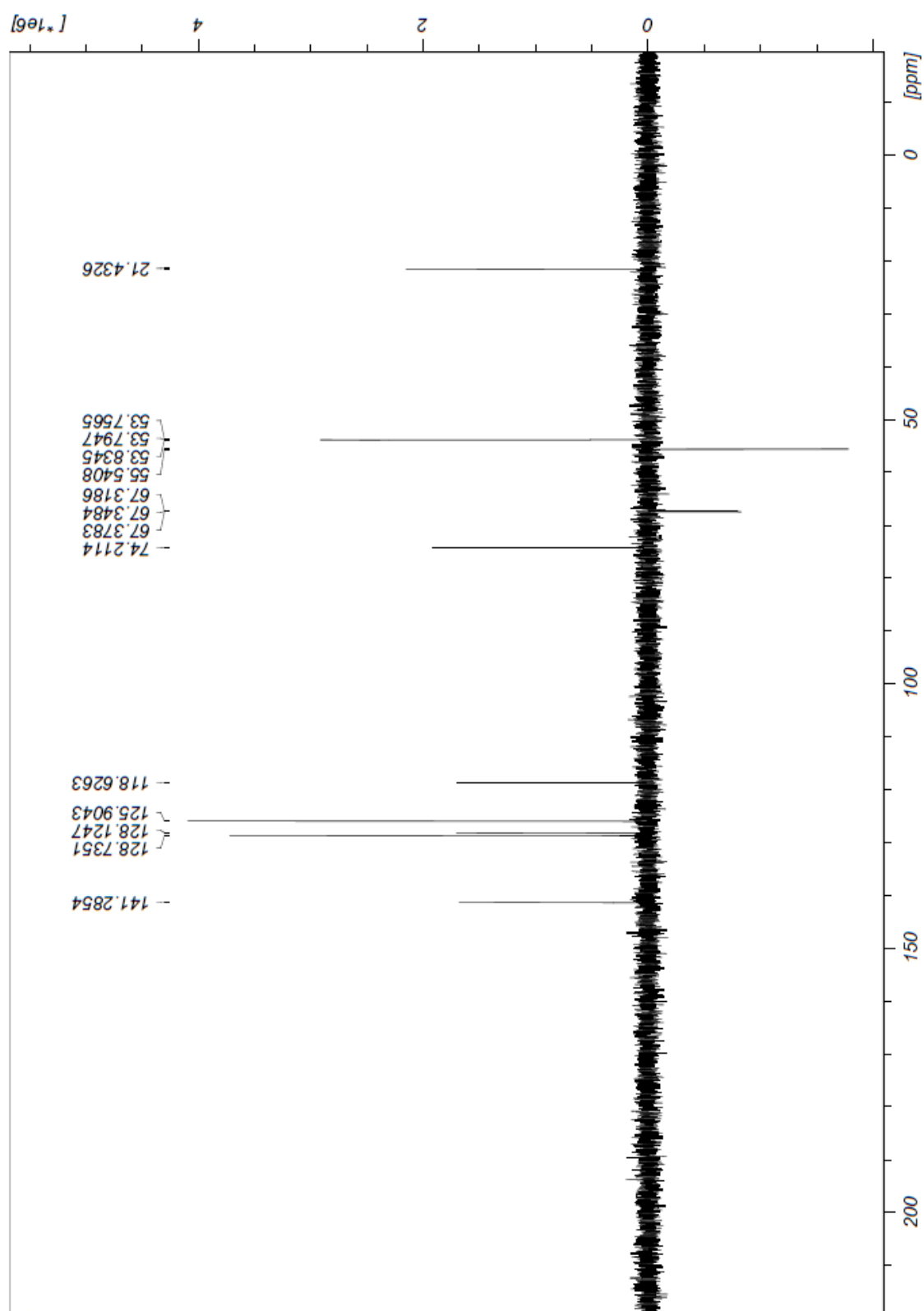


Figura XXIX – Espectro de ^{13}C DEPT RMN (75 MHz) de maleato de (\pm)-1-feniletilo e colina (**46**) em D_2O à temperatura ambiente.

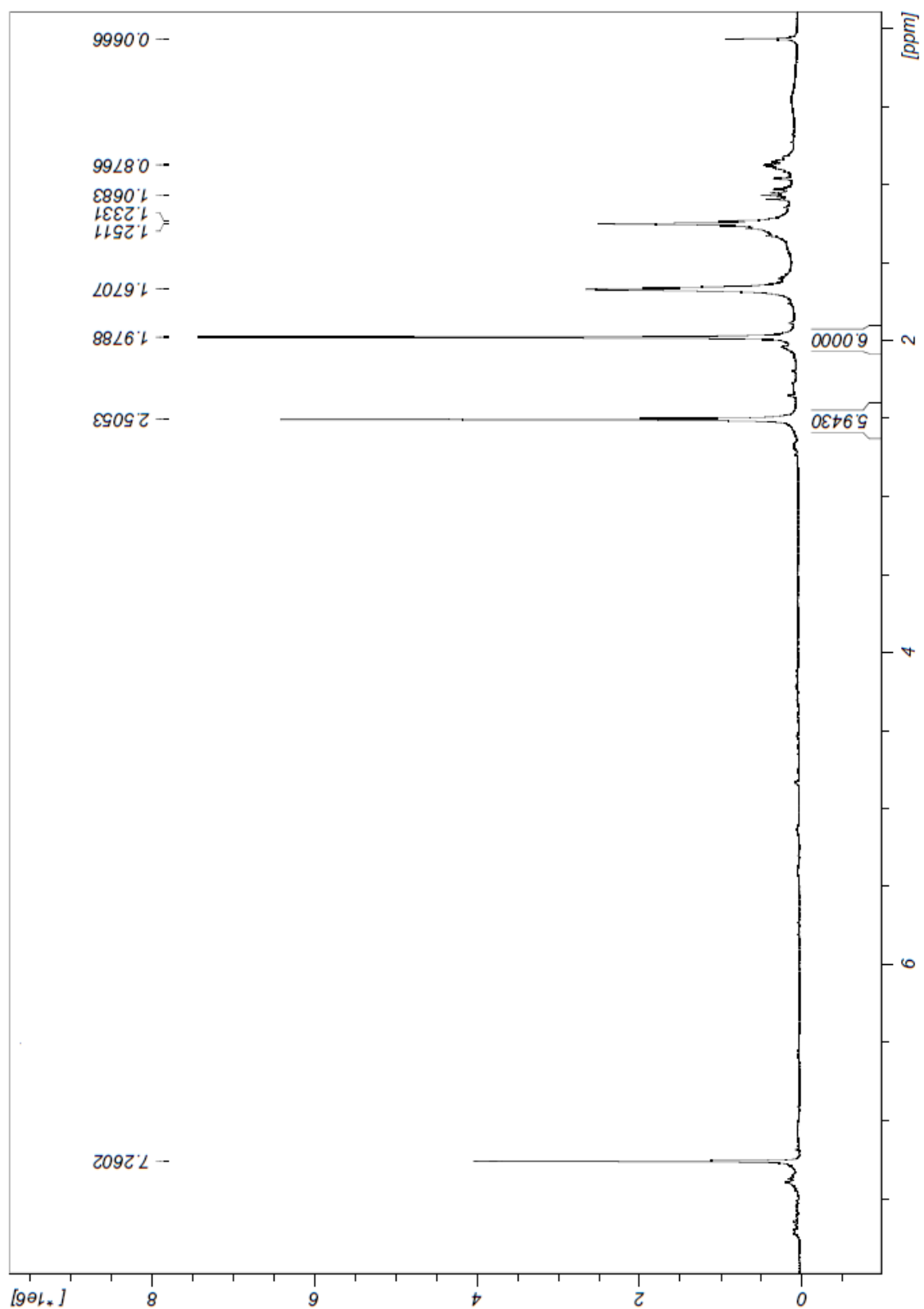


Figura XXX – Espectro de ^1H RMN (300 MHz) de $\text{cis-Rh}_2(\text{OAc})_2(\text{OCOCF}_3)_2$ (**54**) em CDCl_3 à temperatura ambiente.

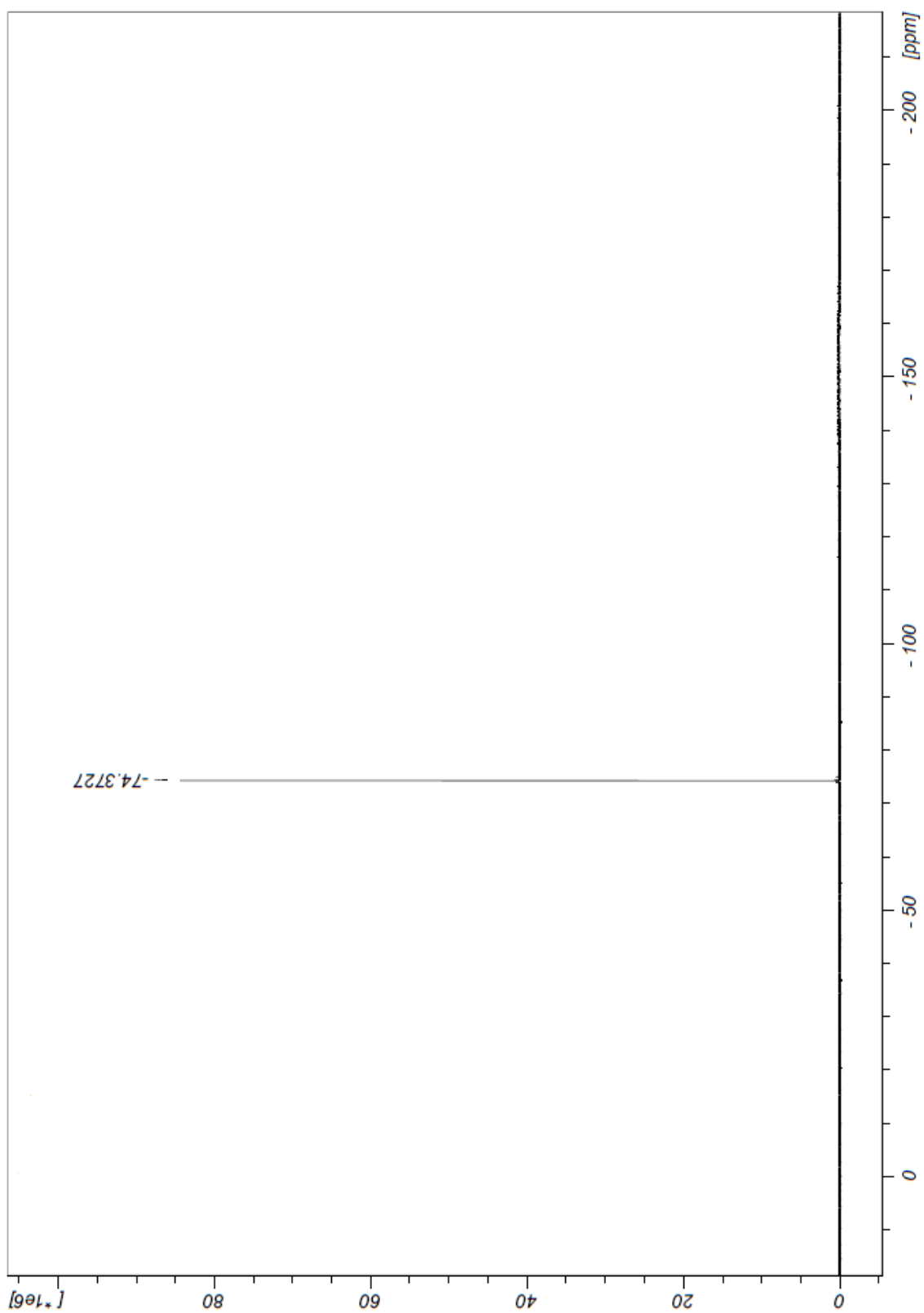


Figura XXXI – Espectro de ^{19}F RMN (282 MHz) de $\text{cis-Rh}_2(\text{OAc})_2(\text{OCOCF}_3)_2$ (**54**) em CDCl_3 à temperatura ambiente.

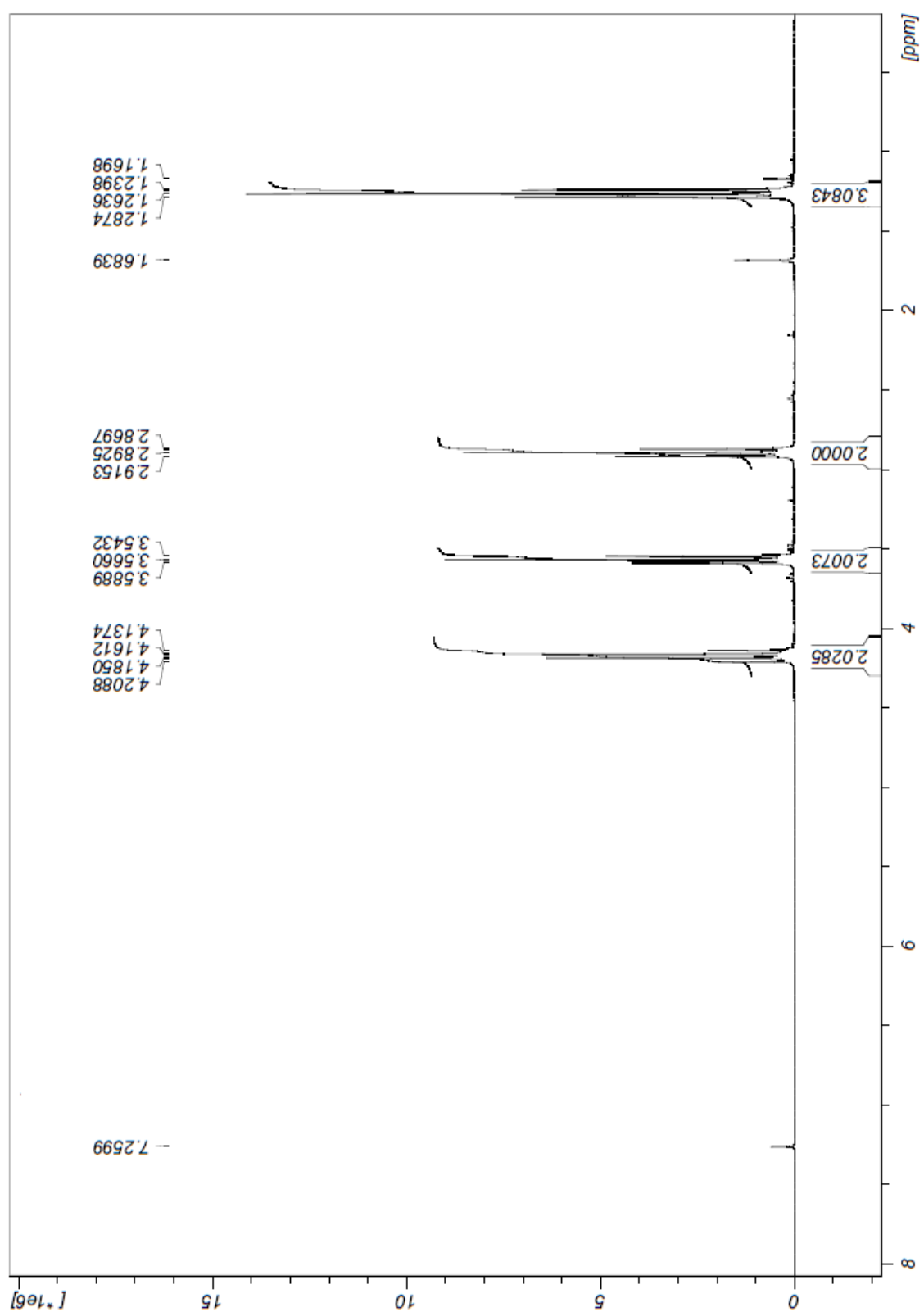


Figura XXXII – Espectro de ^1H RMN (300 MHz) de 3-bromopropanoato de etilo (**60**) em CDCl_3 à temperatura ambiente.

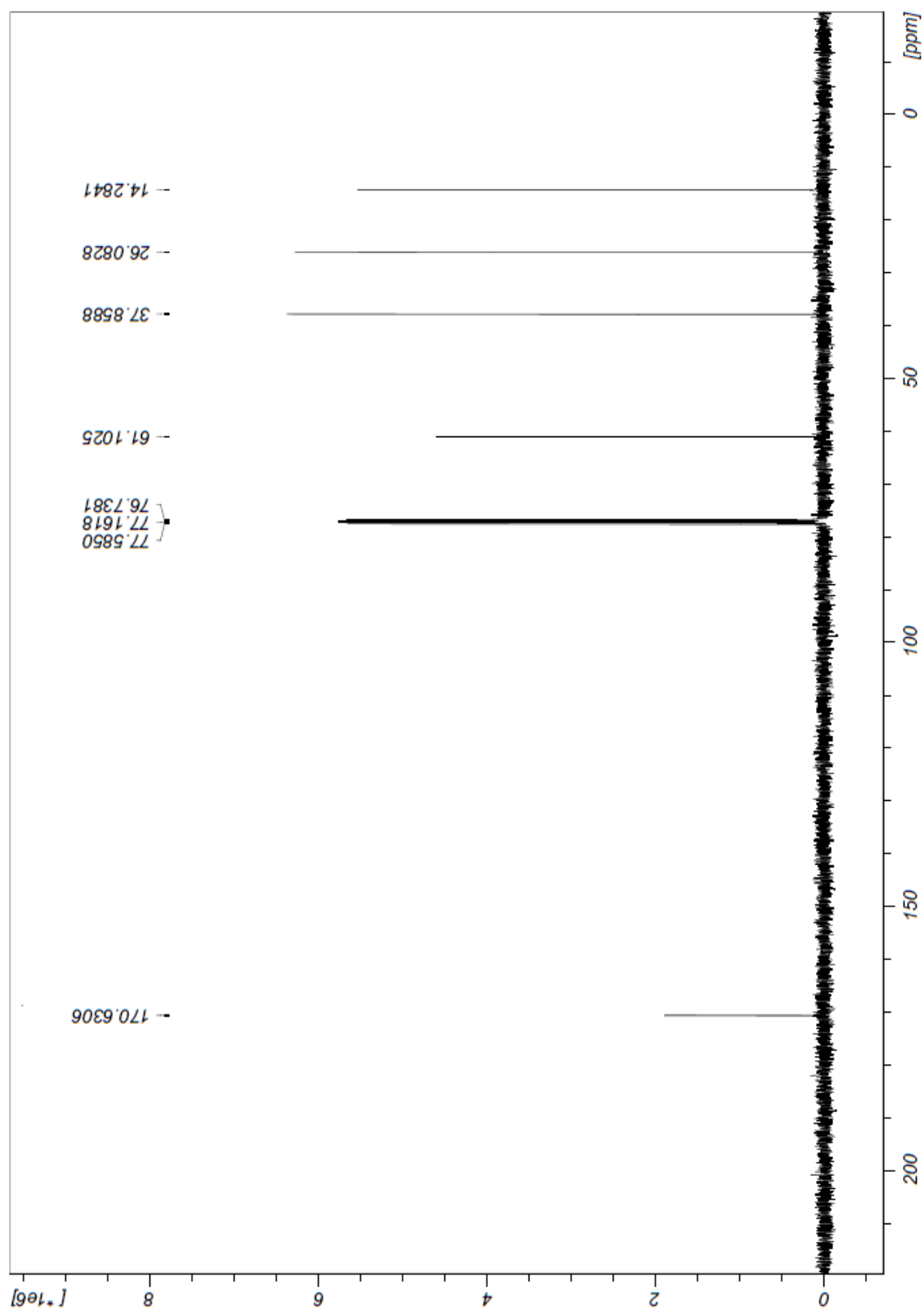


Figura XXXIII – Espectro de ^{13}C RMN (75 MHz) de 3-bromopropanoato de etilo (**60**) em CDCl_3 à temperatura ambiente.

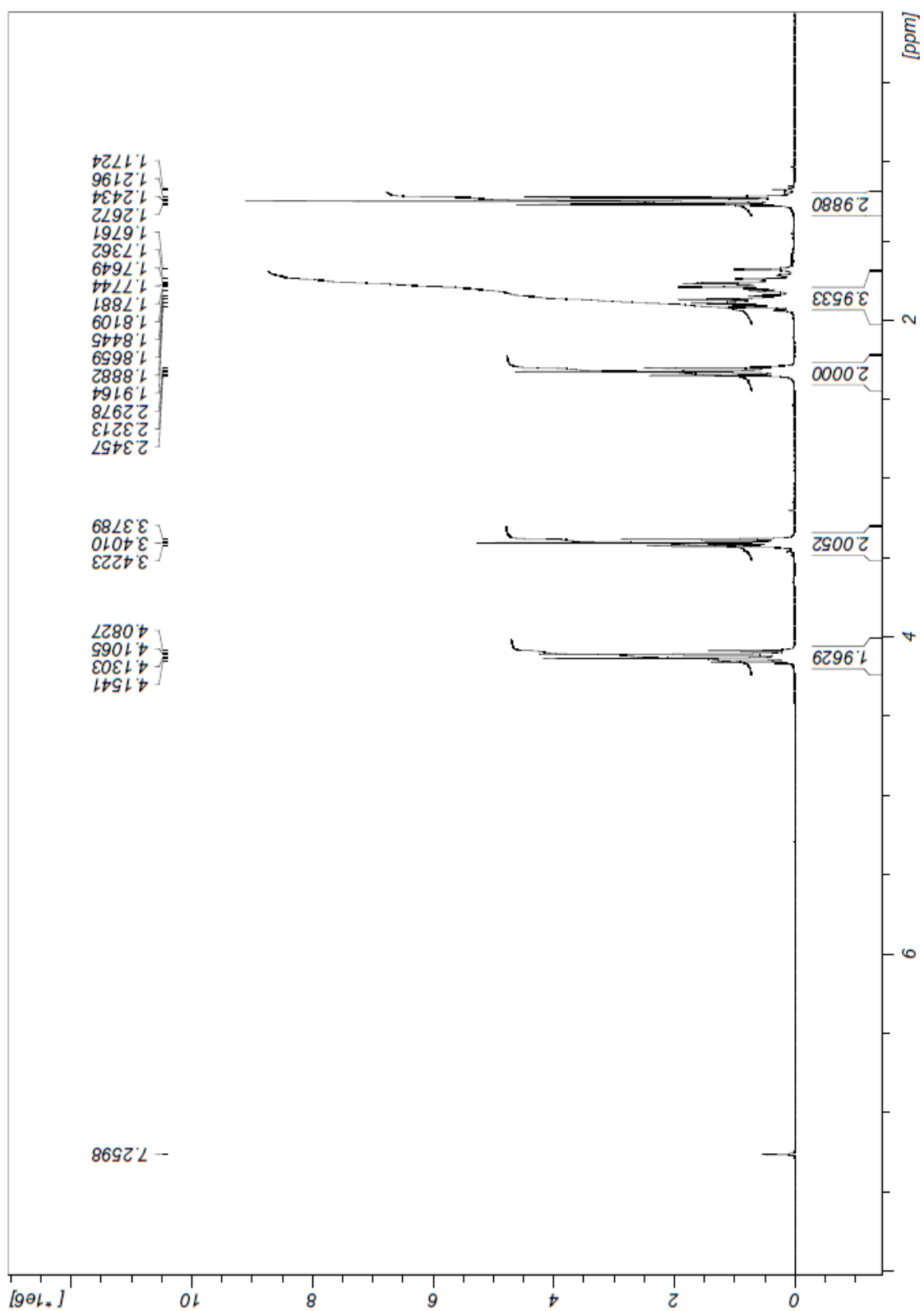


Figura XXXIV – Espectro de ^1H RMN (300 MHz) de 5-bromopentanoato de etilo (**61**) em CDCl_3 à temperatura ambiente.

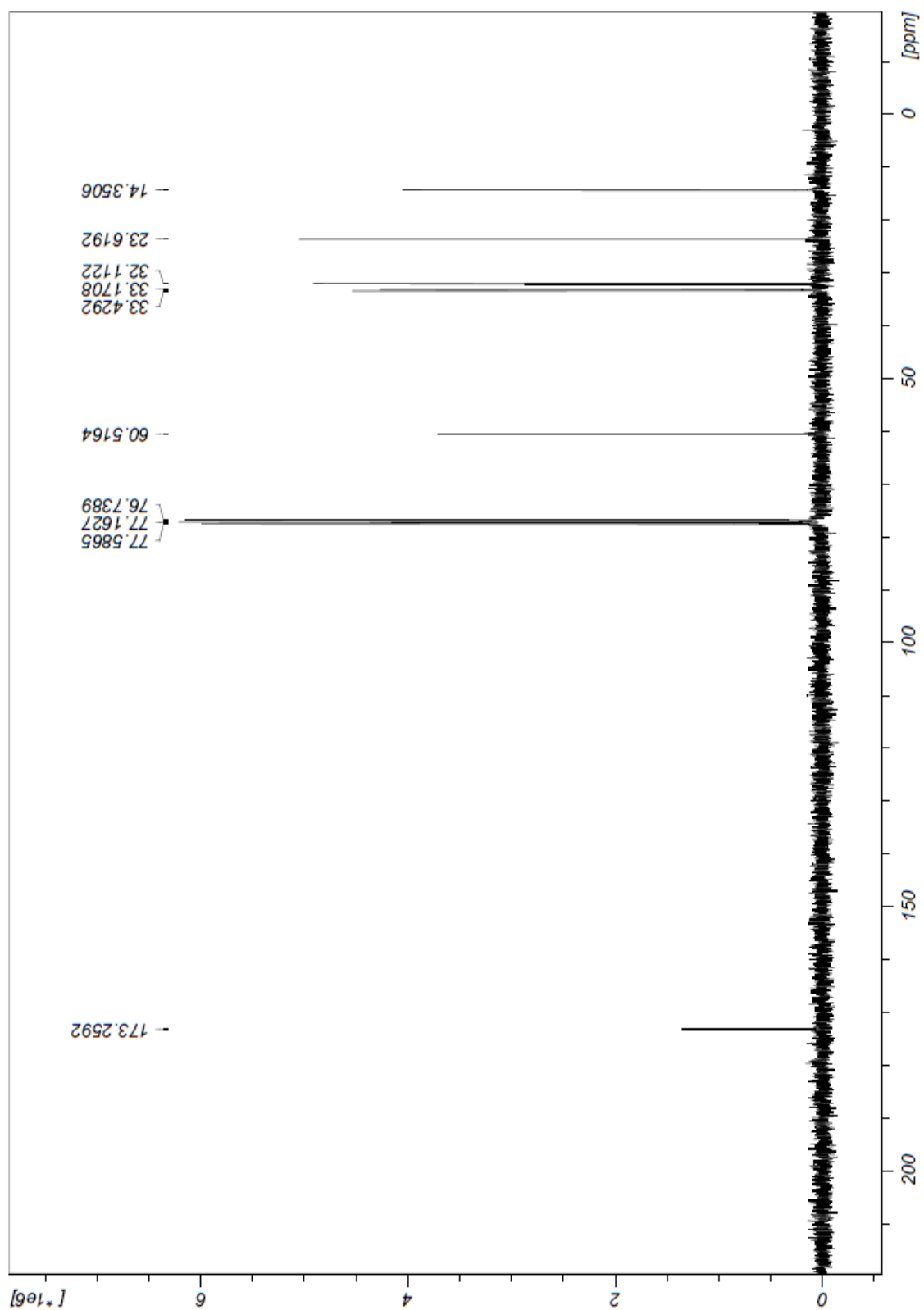


Figura XXXV – Espectro de ^{13}C RMN (75 MHz) de 5-bromopentanoato de etilo (**61**) em CDCl_3 à temperatura ambiente.

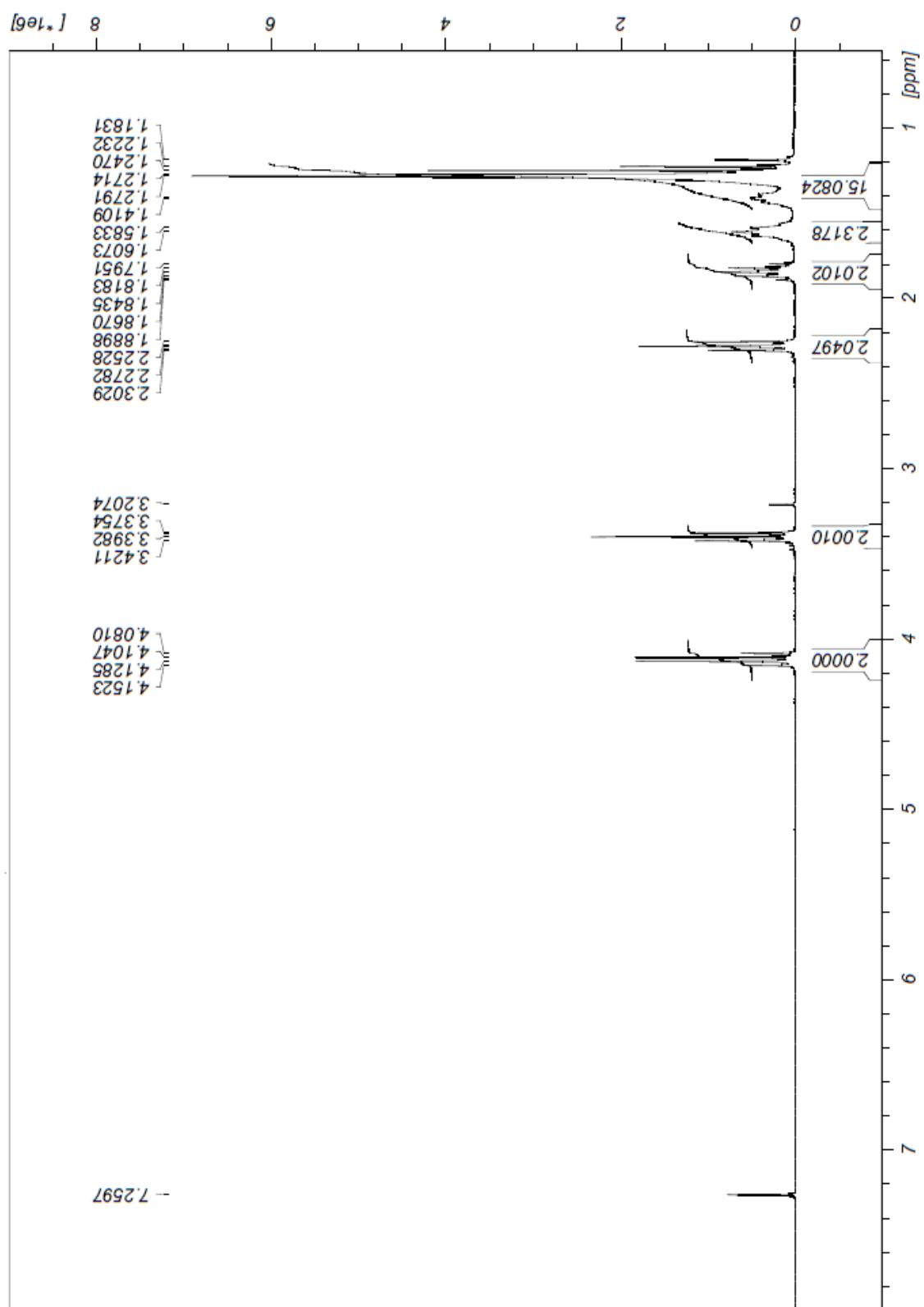


Figura XXXVI – Espectro de ^1H RMN (300 MHz) de 11-bromoundecanoato de etilo (**63**) em CDCl_3 à temperatura ambiente.

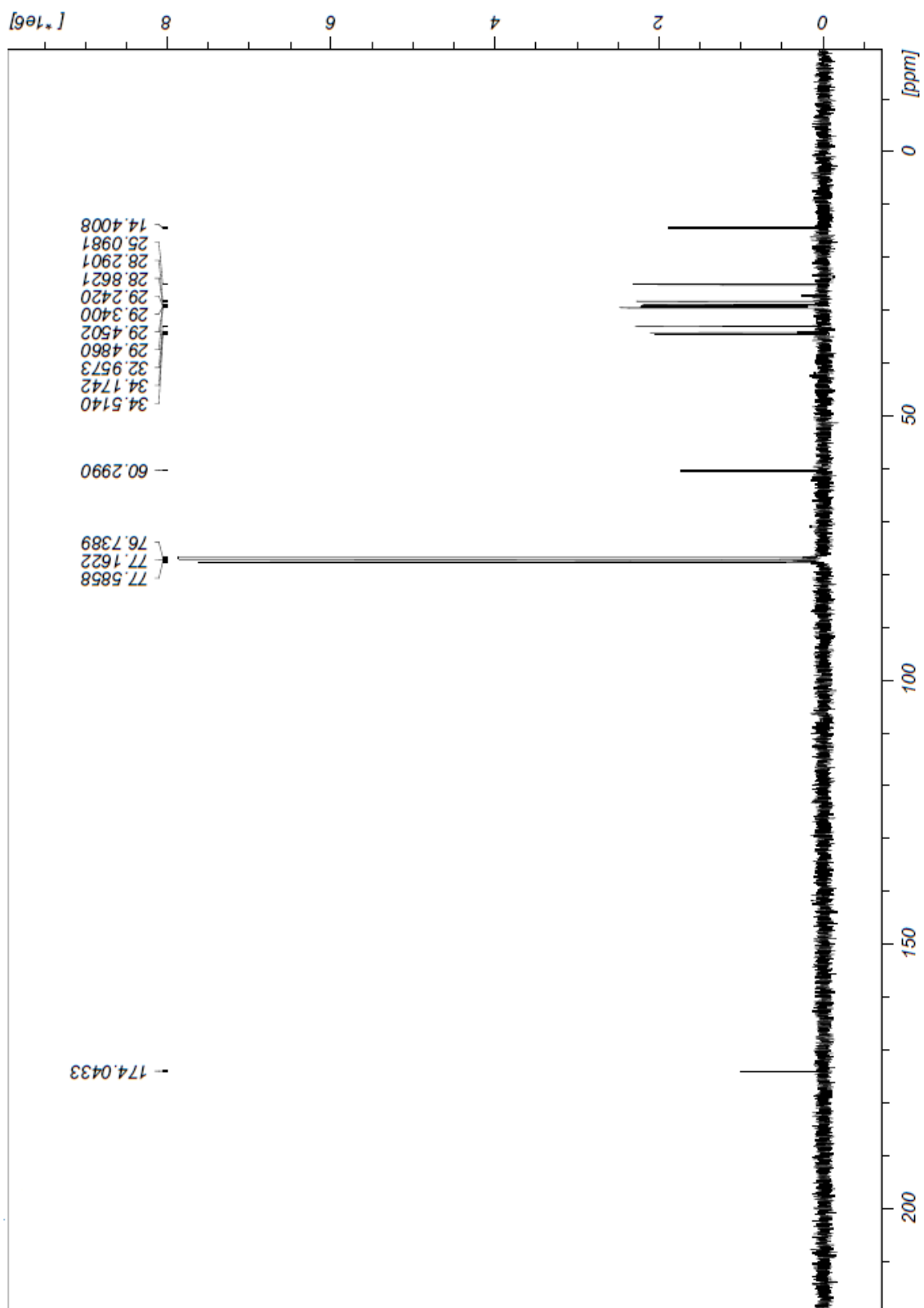


Figura XXXVII – Espectro de ^{13}C RMN (75 MHz) de 11-bromoundecanoato de etilo (**63**) em CDCl_3 à temperatura ambiente.

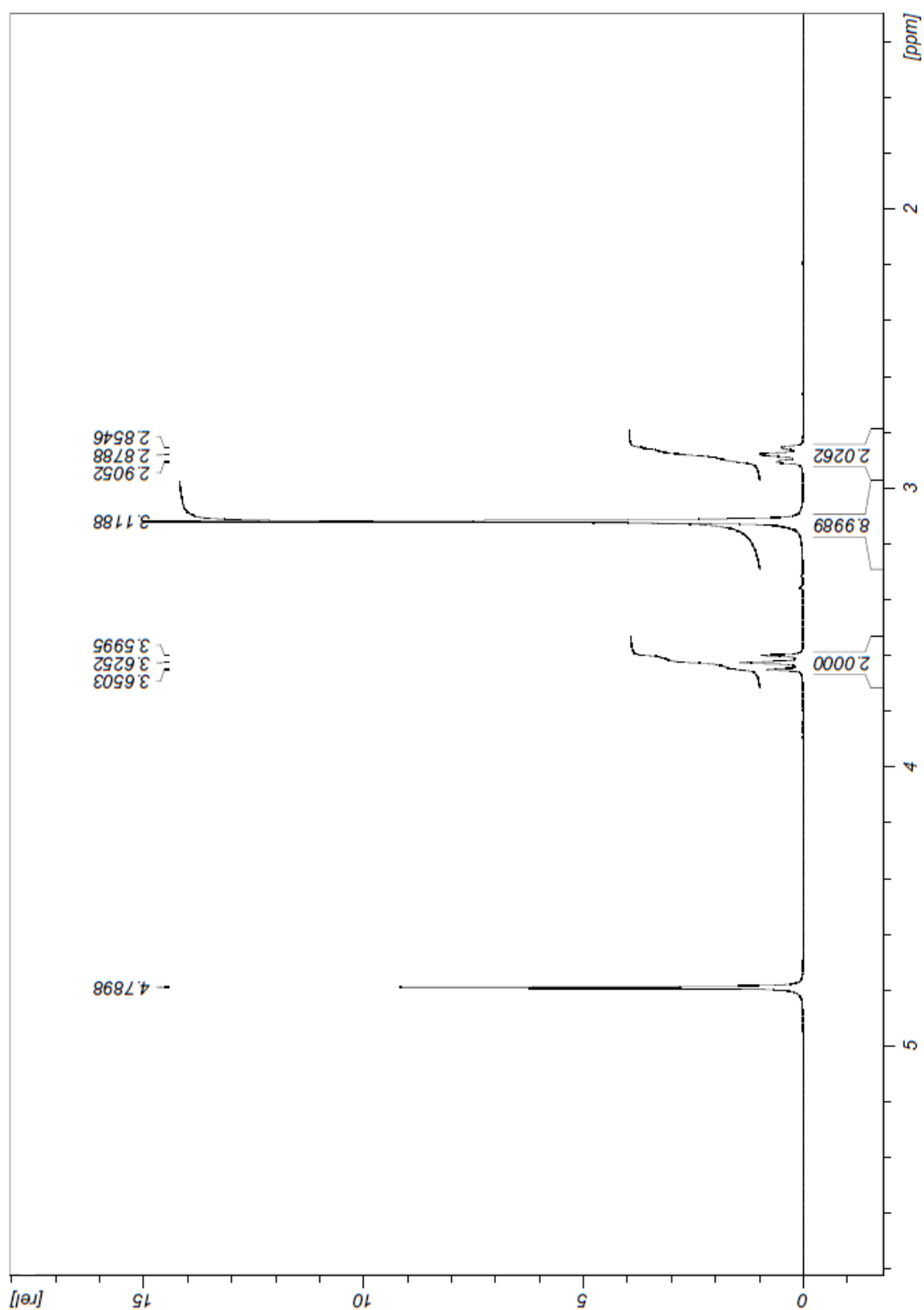


Figura XXXVIII – Espectro de ^1H RMN (300 MHz) de cloreto de [2-(carboxi)etil] trimetilamónio (**64**) em D_2O à temperatura ambiente.

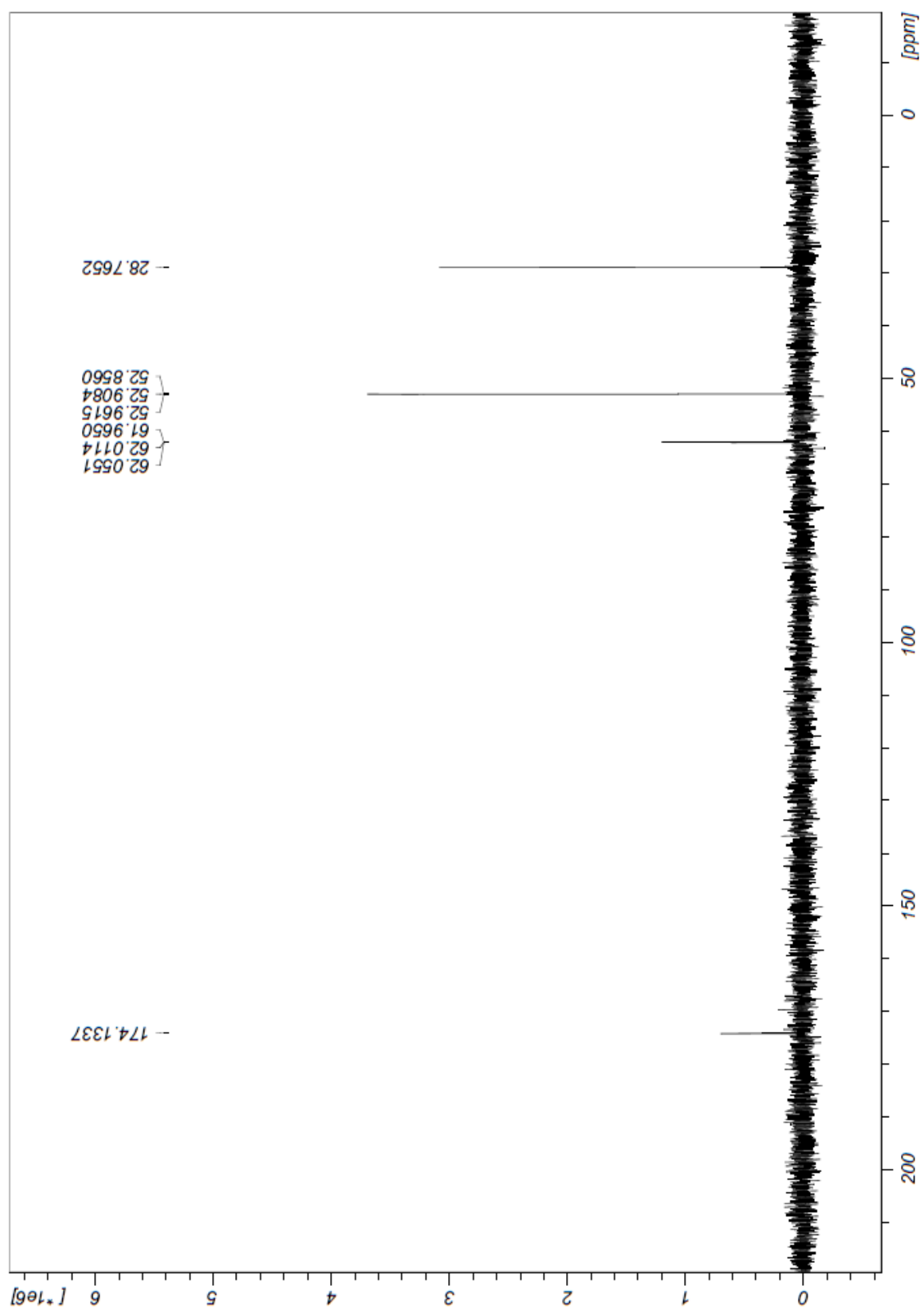


Figura XXXIX – Espectro de ^{13}C RMN (75 MHz) de cloreto de [2-(carboxi)etil] trimetilamónio (**64**) em D_2O à temperatura ambiente.

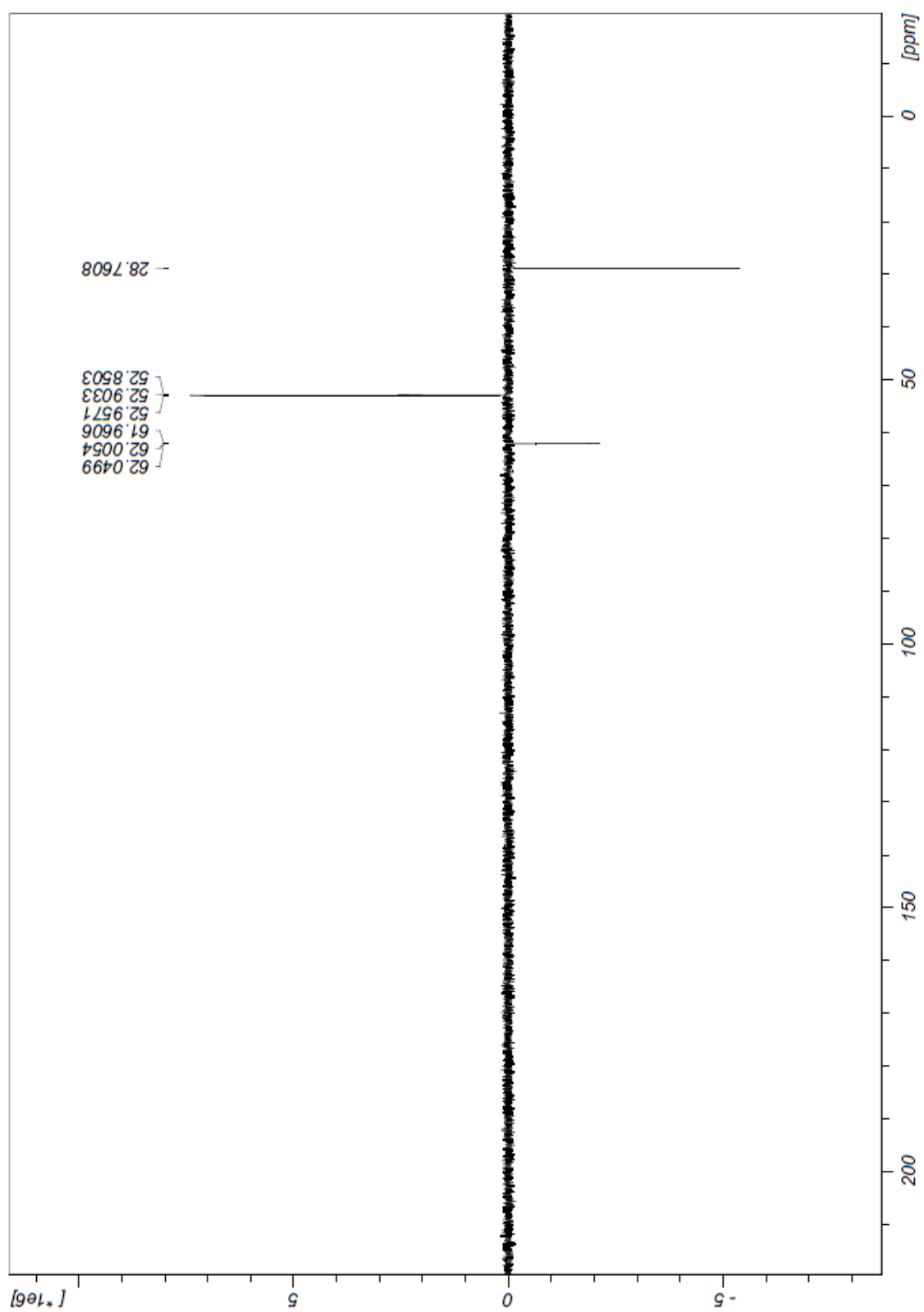


Figura XL – Espectro de ^{13}C DEPT RMN (75 MHz) de cloreto de [2-(carboxi)etil] trimetilamónio (**64**) em D_2O à temperatura ambiente.

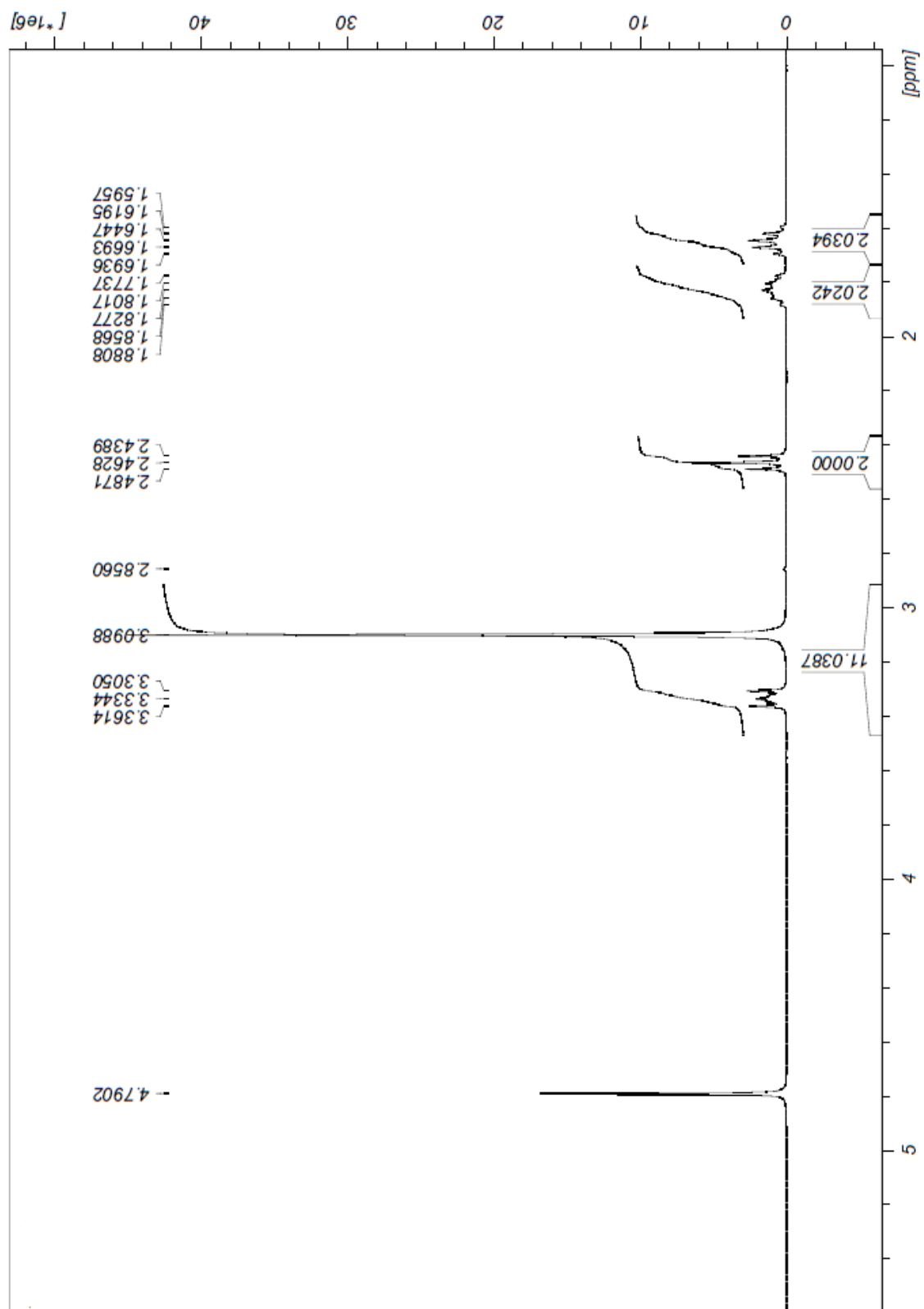


Figura XLI – Espectro de ^1H RMN (300 MHz) de cloreto de [4-(carboxi)butil] trimetilamónio (**65**) em D_2O à temperatura ambiente.

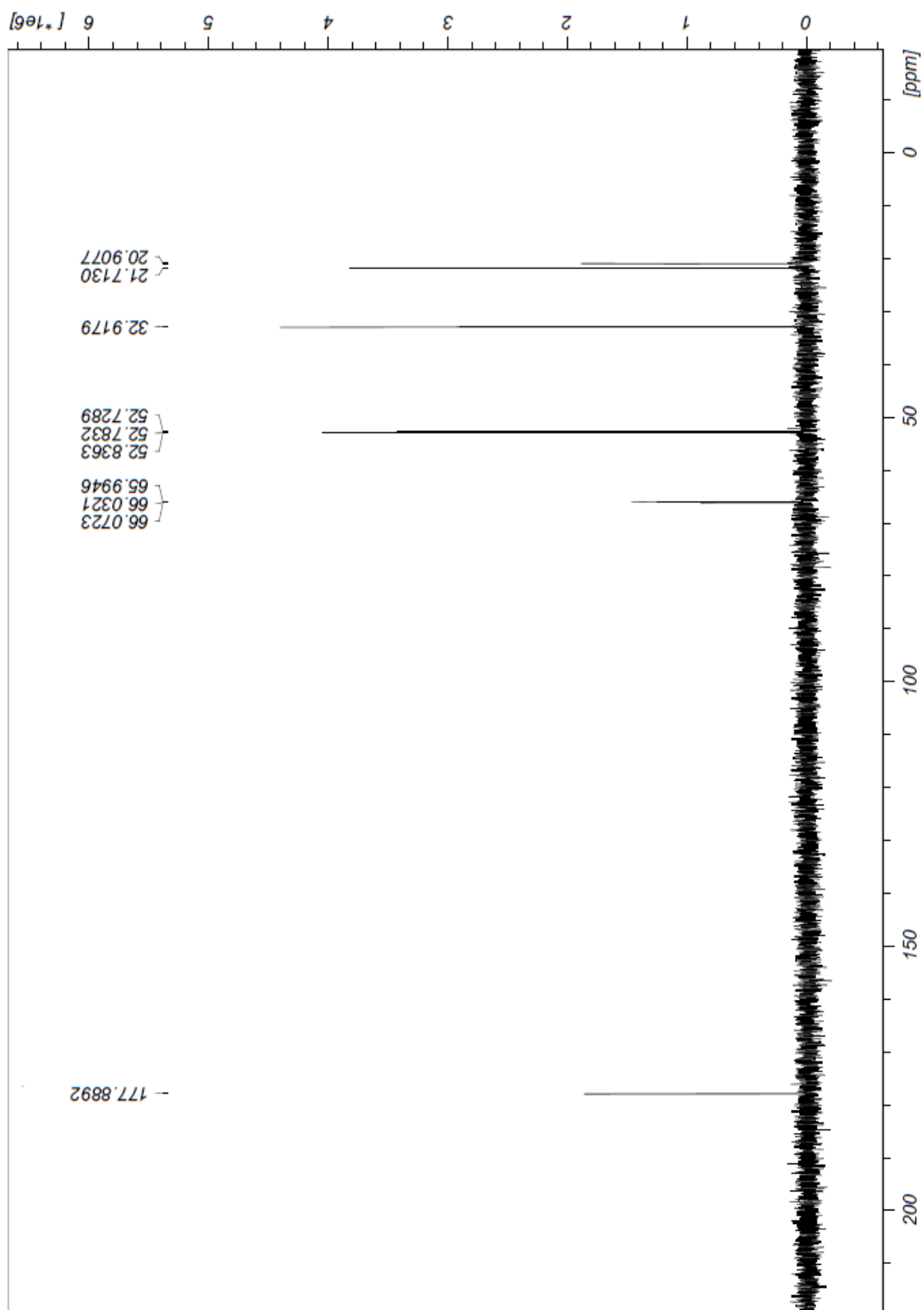


Figura XLII – Espectro de ^{13}C RMN (75 MHz) de cloreto de [4-(carboxi)butil] trimetilamónio (**65**) em D_2O à temperatura ambiente.

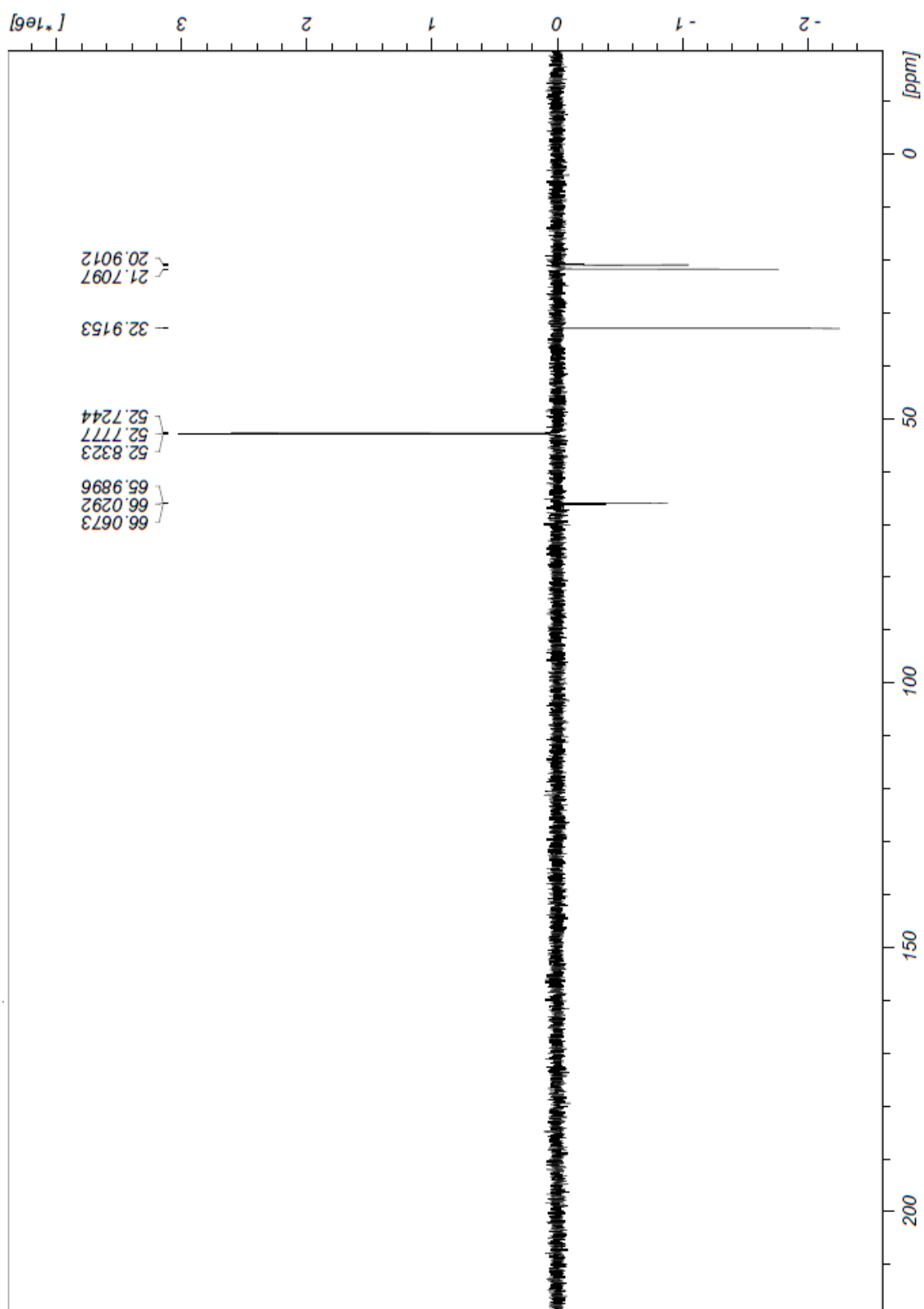


Figura XLIII – Espectro de ^{13}C DEPT RMN (75 MHz) de cloreto de [4-(carboxi)butil] trimetilamônio (**65**) em D_2O à temperatura ambiente.

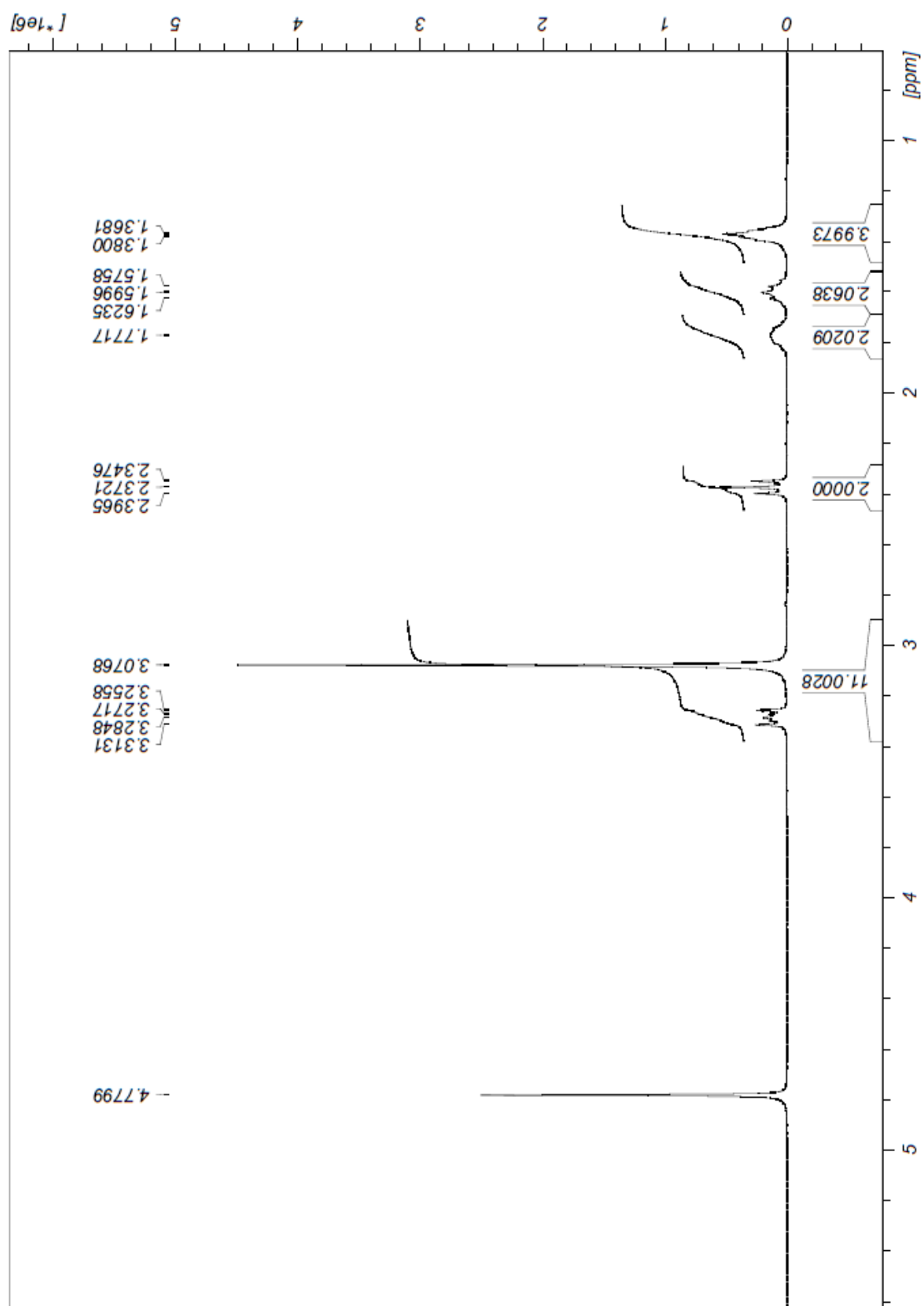


Figura XLIV – Espectro de ^1H RMN (300 MHz) de cloreto de [6-(carboxi)hexil] trimetilamónio (**66**) em D_2O à temperatura ambiente.

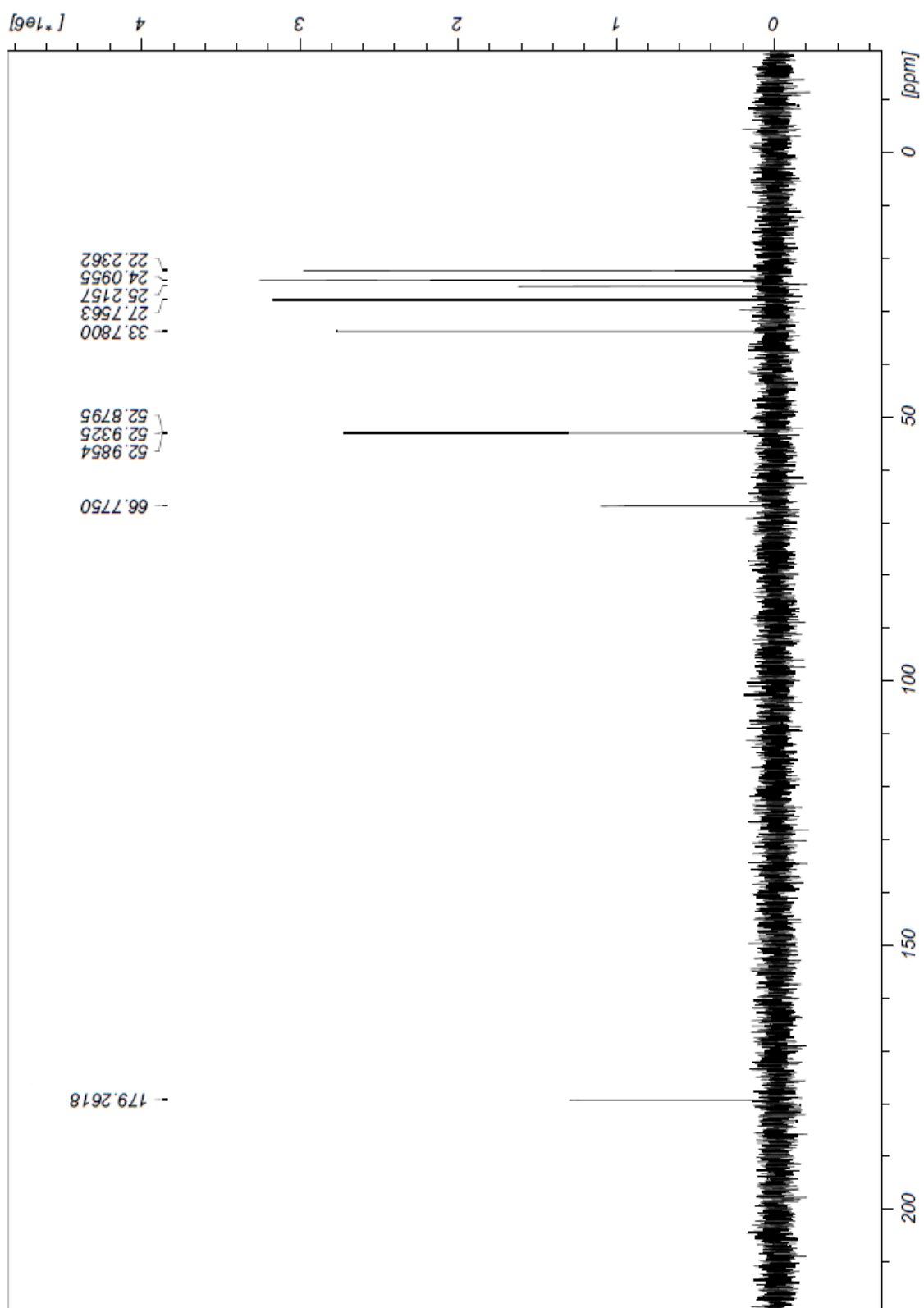


Figura XLV – Espectro de ^{13}C RMN (75 MHz) de cloreto de [6-(carboxi)hexil] trimetilamónio (**66**) em D_2O à temperatura ambiente.

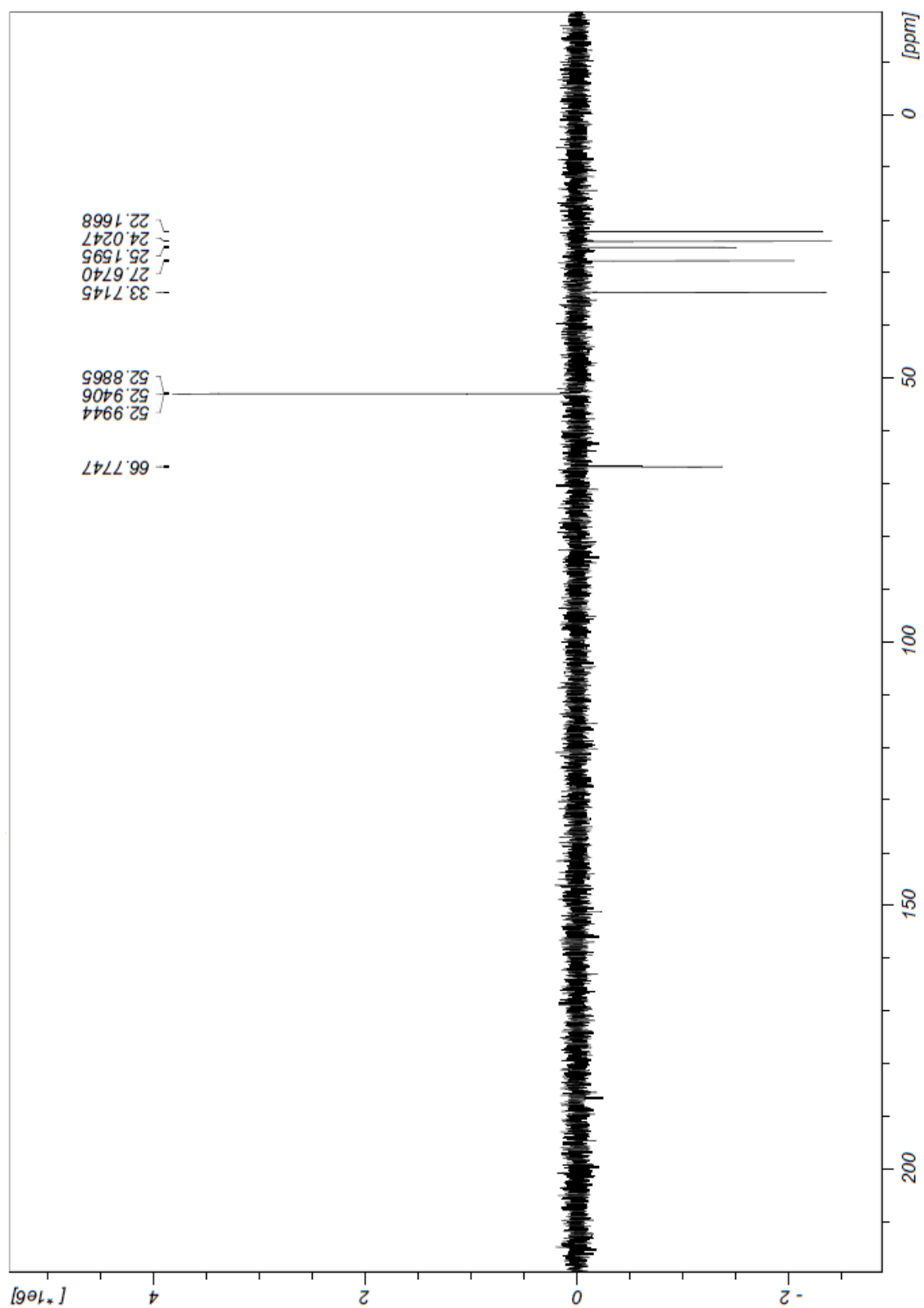


Figura XLVI – Espectro de ^{13}C DEPT RMN (75 MHz) de cloreto de [6-(carboxi)hexil] trimetilamônio (**66**) em D_2O à temperatura ambiente.

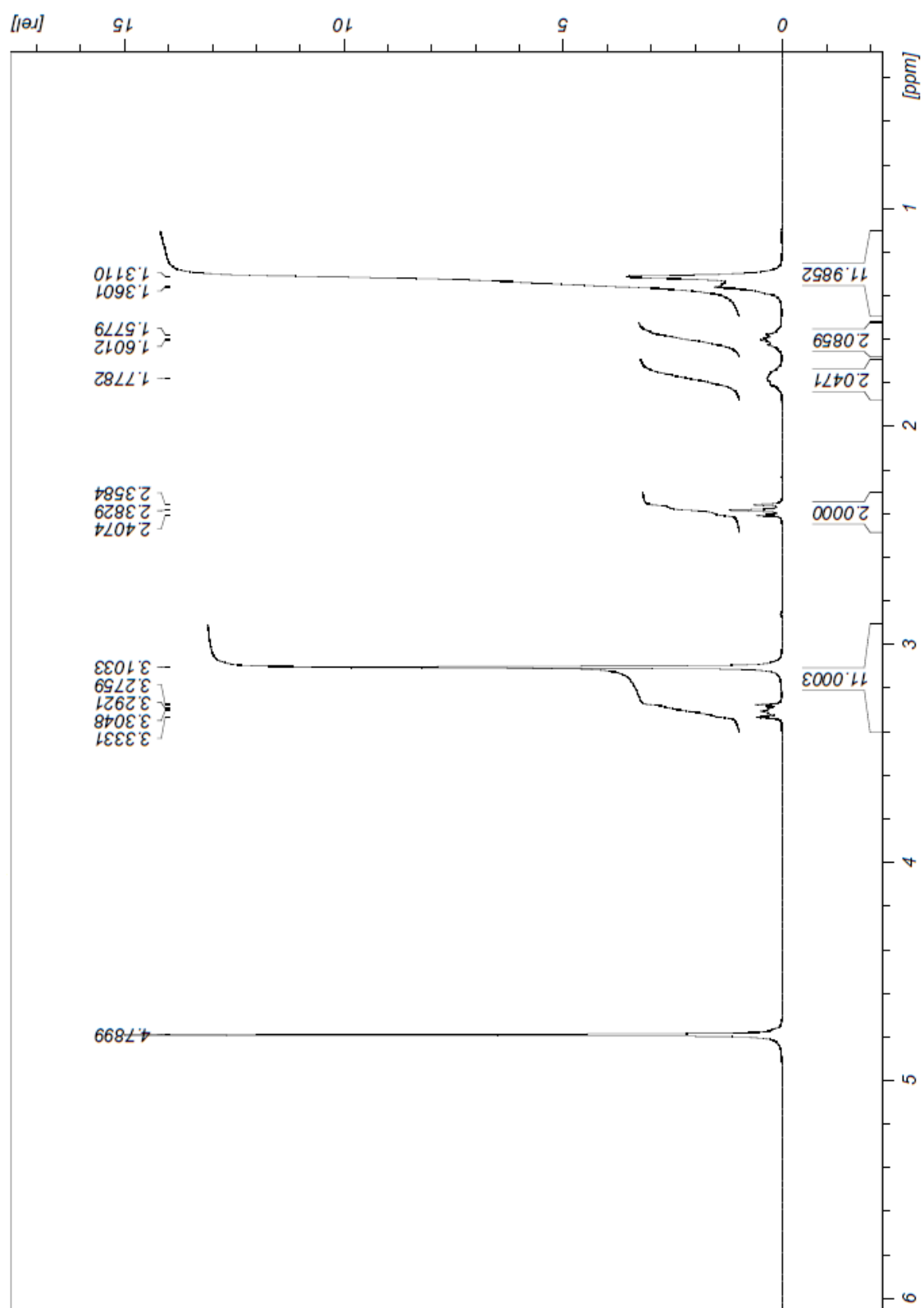


Figura XLVII – Espectro de ^1H RMN (300 MHz) de cloreto de [10-(carboxi)decil] trimetilamónio (**67**) em D_2O à temperatura ambiente.

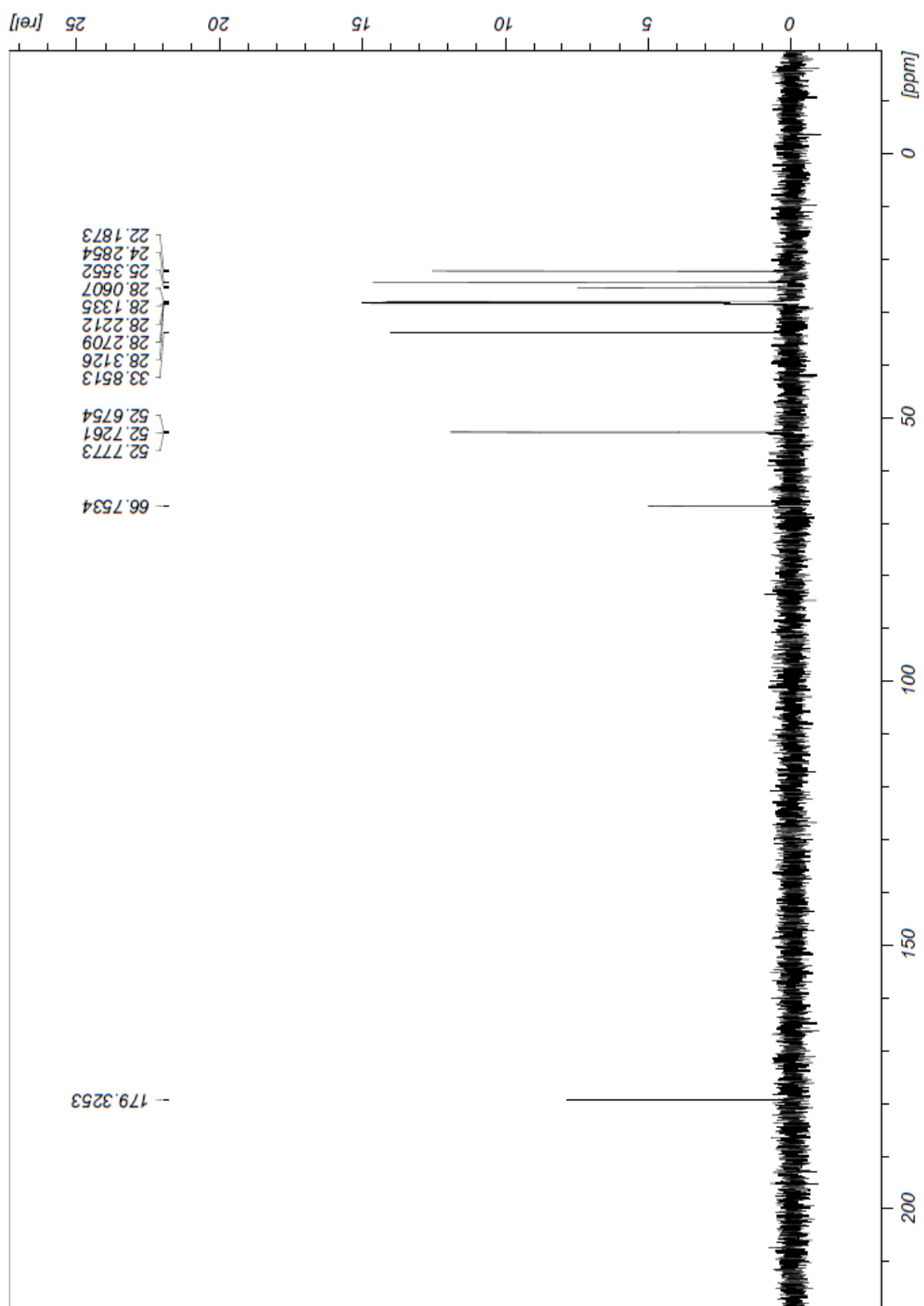


Figura XLVIII – Espectro de ^{13}C RMN (75 MHz) de cloreto de [10-(carboxi)decil] trimetilamónio (**67**) em D_2O à temperatura ambiente.

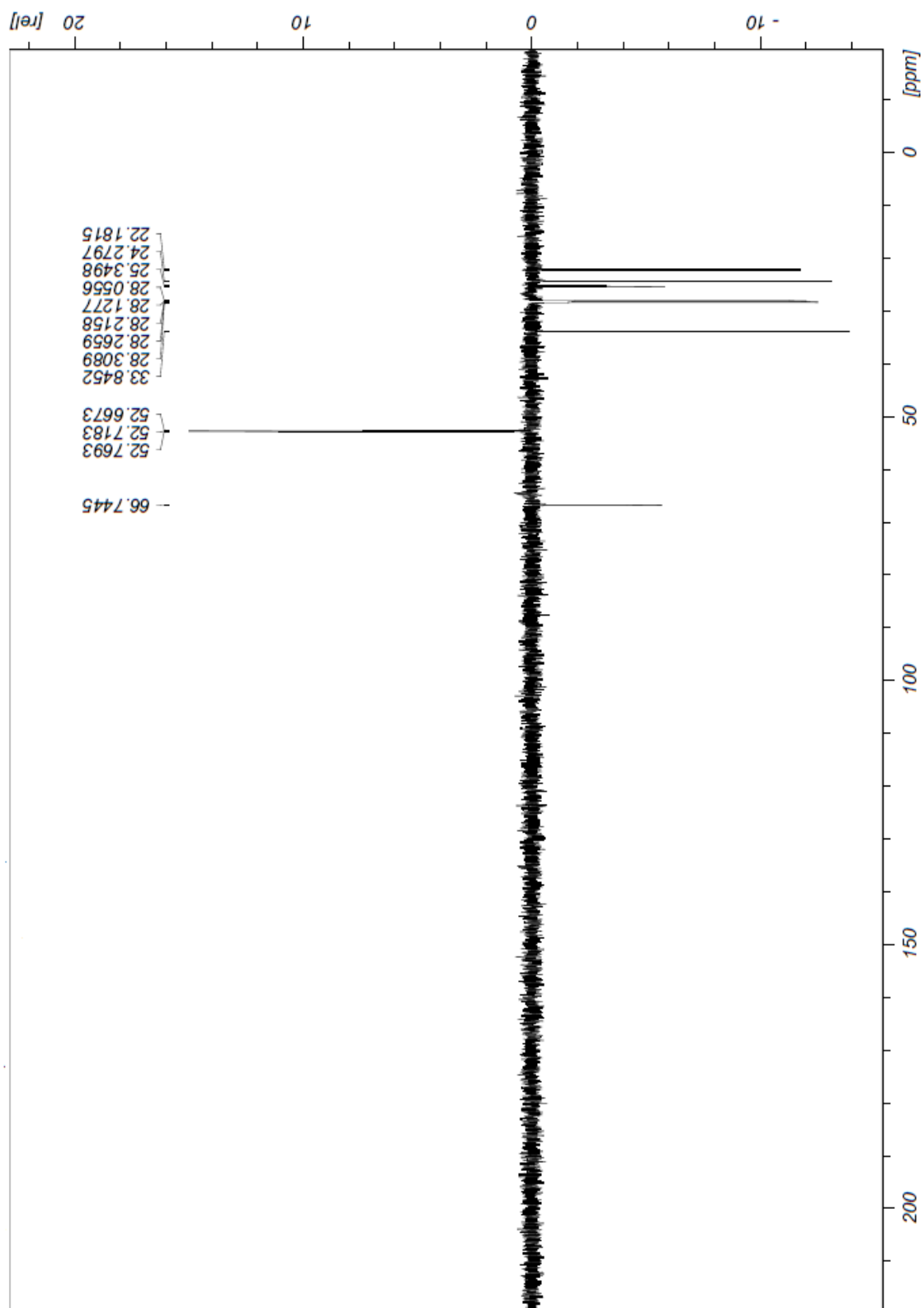


Figura XLIX – Espectro de ^{13}C DEPT RMN (75 MHz) de cloreto de [10-(carboxi)decil] trimetilamônio (**67**) em D_2O à temperatura ambiente.

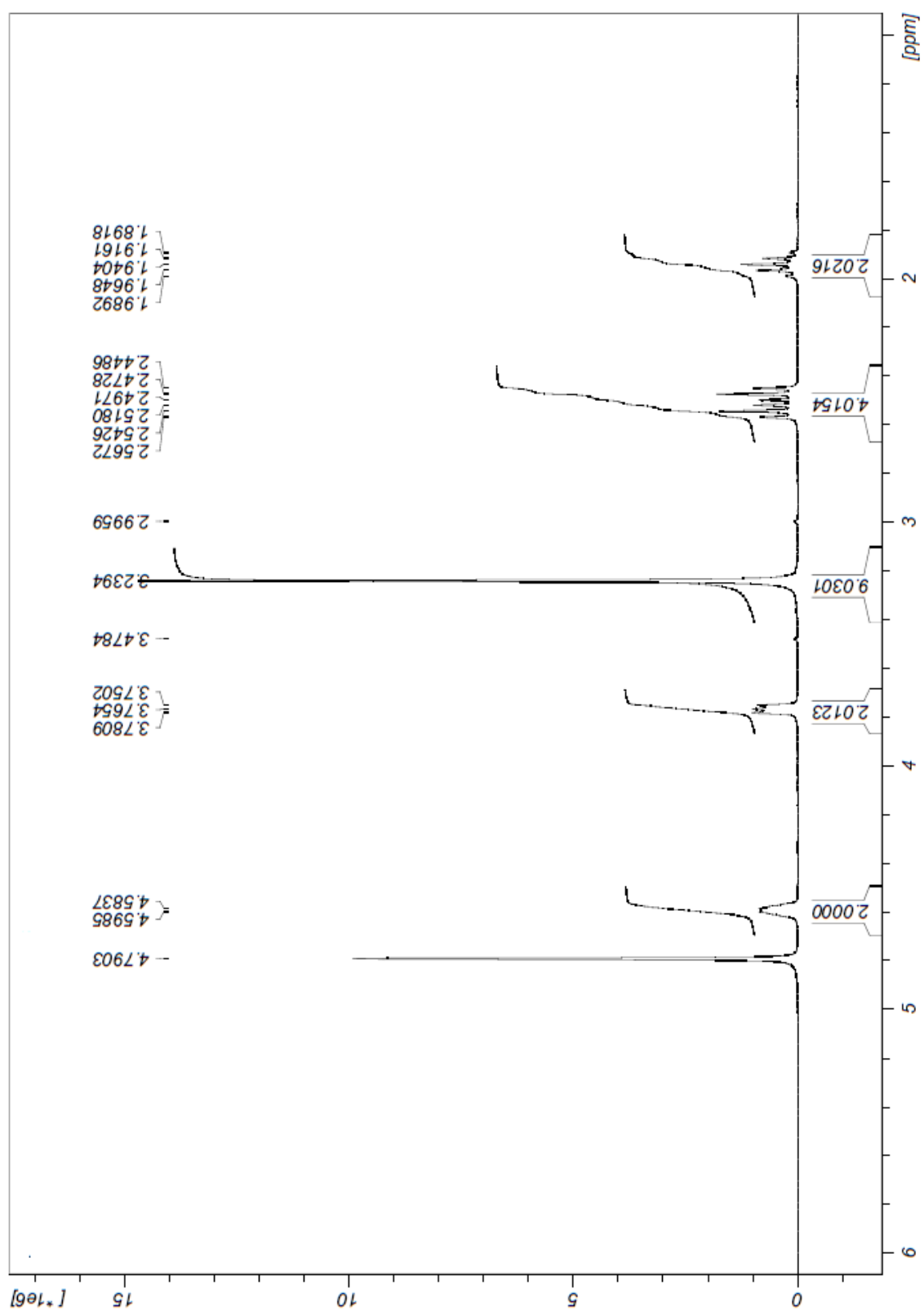


Figura L – Espectro de ^1H RMN (300 MHz) de cloreto de hidrogenoglutarilcolina (**68**) em D_2O à temperatura ambiente.

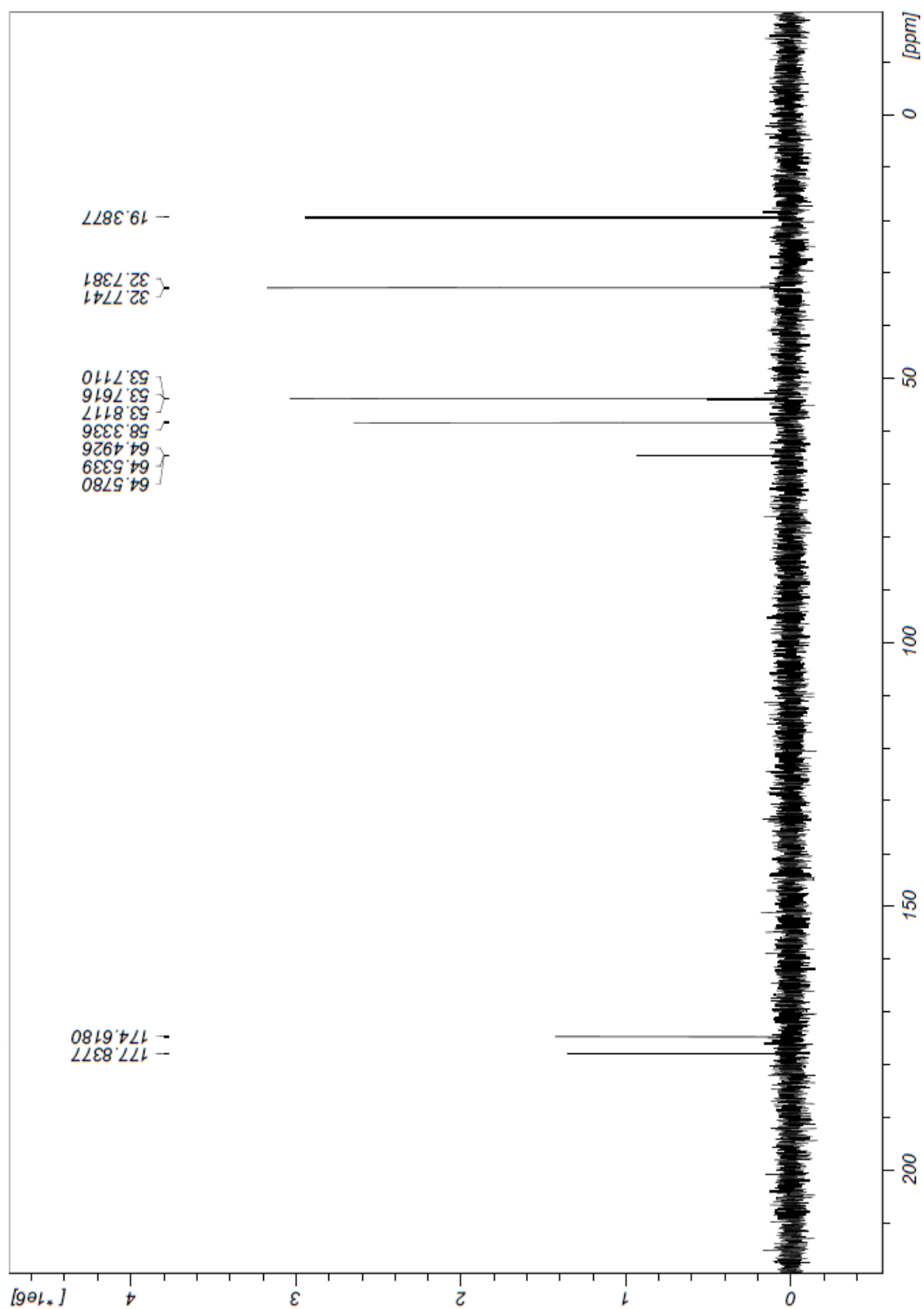


Figura LI – Espectro de ^{13}C RMN (75 MHz) de cloreto de hidrogenoglutarilcolina (**68**) em D_2O à temperatura ambiente.